

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**Aplicação de métodos quimiométricos de calibração e
resolução multivariada de curvas em espectroscopia
Raman para análise qualitativa e quantitativa de
polimorfismo em carbamazepina, clopidogrel e ezetimiba.**

Marco Antonio dos Santos Farias*

Tese apresentada como parte dos requisitos
para obtenção do título de DOUTOR EM
CIÊNCIAS, área de concentração: QUÍMICA
ANALÍTICA.

Orientador: Prof. Dr. Renato Lajarim Carneiro

*** bolsista CNPQ**

**São Carlos - SP
2015**

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária/UFSCar**

F224am Farias, Marco Antonio dos Santos.
Aplicação de métodos quimiométricos de calibração e
resolução multivariada de curvas em espectroscopia Raman
para análise qualitativa e quantitativa de polimorfismo em
carbamazepina, clopidogrel e ezetimiba / Marco Antonio dos
Santos Farias. -- São Carlos : UFSCar, 2015.
100 f.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos,
2015.

1. Polimorfismo (Cristalografia). 2. Quimiometria. 3.
Raman, Espectroscopia de. 4. Fármacos. I. Título.

CDD: 548.3 (20^a)



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia
Programa de Pós-Graduação em Química

Folha de Aprovação

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Tese de Doutorado do candidato Marco Antonio dos Santos Farias, realizada em 31/07/2015:

Prof. Dr. Renato Lajarim Carneiro
UFSCar

Prof. Dr. Paulo Henrique Março
UTFPR

Prof. Dr. Tiago Venâncio
UFSCar

Profa. Dra. Daniely Xavier Soares
FOC

Profa. Dra. Ana Rita de Araujo Nogueira
Embrapa

“Em 3 de junho de 1971 a família Santos chegou em São Paulo. Eram minha avó, avô, mãe e meus 9 tios, alguns deles ainda crianças. Chegaram num dia típico de São Paulo, fazia frio e garoava. O sentimento da chegada não era de alegria, havia uma preocupação, um medo, devido as incertezas dessa nova etapa. Eles saíram de Arapiraca, Alagoas, para tentar uma vida com mais chances, fugindo da falta de perspectiva, da seca, da falta de oportunidades que existia no momento. Encontraram um novo lar em Ferraz de Vasconcelos, São Paulo, onde residem até hoje. Meu avô, semi alfabetizado, encontrou trabalho na linha de trens, colocando os dormentes de madeira onde se fixa os trilhos, depois foi servente de pedreiro e assim por diante. Tal como muitos nordestinos, viu o sonho de se estabelecer em São Paulo se tornar cada vez mais difícil, sendo necessário a ajuda de meus tios para complementar a renda. Logo meus tios começaram a trabalhar e não tiveram tempo de acalantar o sonho de se formar em uma universidade, era uma realidade muito distante. Apenas duas tias conseguiram se formar em um curso superior. Na infância vivida em Alagoas, minha mãe e meus tios mais velhos contam como o meu avô, os ensinou a ler e a realizar as operações básicas da matemática, já que a escola mais próxima era muito distante de onde moravam, contam como meu avô anotava a data e a hora de nascimento de cada um dos filhos em um caderninho, para anos mais tarde levar todos eles para serem registrados de uma única vez, já que não havia cartório na cidade onde moravam. Este era o cenário vivido pelos meus avós e tios.

A medida que o tempo foi passando, a família se estabeleceu e os netos foram chegando. Meu avô, um homem duro por conta da própria cultura em que foi criado, foi amolecendo com a chegada dos netos. Os netos, por sua vez, começaram a crescer e a ter os sonhos que seus pais não puderam ter. Foi assim que os planos do meu avô e avó foram se tornando realidade. Dentre os netos eu fui o primeiro a conseguir estudar em uma Universidade Pública onde me formei Bacharel em Química, consegui o título de mestre e agora conquistarei o título de Doutor em Química em uma das universidades mais importantes desse País (UFSCar).

Há uma frase da música clube da esquina nº 2, composta pelos irmãos Lô Borges, Marcio Borges e Milton Nascimento que diz: “os sonhos não envelhecem”. Acho que nesse momento realizo um sonho do meu avô, que precisou de 90 anos para viver essa experiência, e de minha avó (in memorian) de ter um membro da família com o título de Doutor.”

Dedico, portanto, essa tese ao meu avô, Paulo Elias dos Santos, e a minha avó, Maria Cecília da Conceição (in memorian).

AGRADECIMENTOS

A minha família, especialmente ao meu irmão Paulo, pelo esforço, pela compreensão e por acreditar na realização desta etapa, sem eles seria impossível.

Ao Prof. Dr. Renato Lajarim Carneiro pela oportunidade concedida, orientação e paciência durante esse período de 4 anos.

Aos meus companheiros de laboratório, em especial ao Fred e ao Jorgito pela ajuda e pelos momentos de descontração e pela criação de um bom ambiente de trabalho.

A Camila pela paciência, carinho e companheirismo ao longo desses dois anos.

Aos amigos da Academia do Choro: Mauricio Tagliadello, Tiago Veltrone, Renan Bertho, Ricardo Cury, Edgard Regolão Jr, Keila Yonashiro, Luanda Souza, Fernando Gorodski Reisler (Israel), Flavia Prazeres, Carlão, pelas rodas de choro e grande amizade.

Aos amigos em São Carlos: Geiser, Loriz, aos amigos dos treinos no Kartodromo, especialmente ao Kleber pela orientação e paciência.

Aos companheiros da turma de Química de 2004 que iniciaram essa jornada em São Carlos junto comigo, especialmente ao Luiz Gorup, ao Marcos Takashi (Jiraia), e a Manu pelos anos de amizade.

LISTA DE ABREVIATURAS

- ALS** Alternating Least Squares (Mínimos Quadrados Alternados)
- ATR** Attenuated Total Reflectance (Reflectância Total Atenuada)
- BCS** Biopharmaceutical Classification System (Sistema de Classificação Biofarmacêutica)
- BEFA** Backward Evolving Factor Analysis (Análise de Fatores Evolucionários para trás)
- CBZ** Carbamazepina
- DRX** Difração de Raios-X
- DSC** Differential Scanning Calorimetry (Calorimetria Diferencial de Varredura)
- DTA** Differential Thermal Analysis (Análise Térmica Diferencial)
- EFA** Evolving Factor Analysis (Análise de Fatores Evolucionários)
- FAR-IR** Far infrared (Infravermelho Distante)
- FEFA** Forward Evolving Factor Analysis (Análise de Fatores Evolucionários para frente)
- FT** Fourier Transform (Transformada de Fourier)
- FT-IR** Fourier Transform Infrared (Infravermelho com Transformada de Fourier)
- HPLC** High Performance Liquid Chromatography (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência)
- HSM** Hot-Stage Microscopy (Microscopia com estágio com aquecimento)
- iPLS** Interval PLS (PLS por intervalos)
- MCR** Multivariate Curve Resolution (Resolução Multivariada de Curvas)
- MIR** Mid infrared (Infravermelho Médio)
- NIPALS** Non-linear iterative Partial Least Squares (Mínimos Quadrados Parciais Iterativo Não-linear)
- NIR** Near infrared (Infravermelho Próximo)
- PAT** Process Analytical Technology (Tecnologia Analítica em Processo)
- PC** Principal Component (Componente Principal)
- PCA** Principal Component Analysis (Análise por Componentes Principais)
- PLS** Partial Least Squares Regression (Regressão por Quadrados Mínimos Parciais)
- RMN** Ressonância Magnética Nuclear
- RMSEC** Root Mean Square Error of Calibration (Raiz Quadrada do Erro Médio de Calibração)
- RMSECV** Root Mean Square Error of Cross Validation (Raiz Quadrada do Erro Médio de Validação Cruzada)
- RMSEP** Root Mean Square Error of Prediction (Raiz Quadrada do Erro Médio de Predição)
- SIMPLS** Statistically Inspired Modification of PLS (Modificação do PLS Inspirada Estatisticamente)

SVD Singular Value Decomposition (Decomposição de Valores Singulares)

TGA Thermogravimetric Analysis (Análise Termogravimétrica)

US. FDA United States Food and Drug Administration (Agência Americana de Drogas e Alimentos)

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. 1: Comprimentos de onda correspondentes à região do infravermelho.....	13
TABELA 2- 1: Arranjo experimental do tipo ternário, a distribuição dos níveis no conjunto de calibração	29
TABELA 3- 1: Massa dos polimorfos nas amostras de calibração e validação.....	42
TABELA 3- 2: Parâmetros analíticos e de calibração da regressão PLS por seleção de variáveis.....	47
TABELA 4- 1: Massa dos polimorfos de carbamazepina em mg, para as amostras de calibração e validação.....	56
TABELA 4- 2: Parametros para o modelo de iPLS para espectroscopia Raman (% massa/massa).....	59
TABELA 5- 1: Proporção na formulação (% massa/massa) ^a , umidade (% massa/massa) ^b e contribuição no conteúdo de água no comprimido (mg) de cada excipiente nos comprimidos feitos em laboratório ^c	68
TABELA 5- 2:Distância entre os oxigênios (Å) nas estruturas cristalinas de EZT-An e EZT-H.	71
TABELA 5- 3: Parametros do modelo PLS para EZT-H e EZT-An (erros dado em % massa/massa).....	75
TABELA 6- 1: Massa em mg dos polimorfos de CBS contidos nos conjuntos de calibração de validação.....	81
TABELA 6- 2: Parametros para o modelo iPLS para espectroscopia Raman, valores dado em % massa/massa.	84
TABELA 6- 3: Parametros para o modelo iPLS para espectroscopia infravermelho, valores dado em % massa/massa.....	87

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. 1: Forma I (taxa de dissolução mais elevada) do princípio ativo Ritonavir. Essa figura não representa a conformação tridimensional da molécula	3
Figura 1. 2: Forma II (taxa de dissolução mais baixa) do princípio ativo Ritonavir, termodinamicamente mais estável. Essa figura não representa a estrutura tridimensional da molécula.....	3
Figura 1. 3:a) Quando não ocorre nenhum evento térmico, b) quando ocorre processo exotérmico, c) processo exotérmico para sistema térmico diferencial, d) quando ocorre processo endotérmico, e) quando ocorre processo endotérmico para sistema térmico diferencial. Figura extraída da referência ¹⁵	6
Figura 1. 4: Plano de difração de um cristal onde os raios-x estão sendo incididos e difratados. Figura extraída da referência ²⁰	9
Figura 1. 5: Os 14 arranjos cristalinos possíveis para um sólido (redes de Bravais).	11
Figura 1. 6: Esquema de um instrumento de Difração de raio-x. Figura extraída da referência ²⁰	11
Figura 1. 7: Sensibilização do detector pelas linhas de difração referente aos planos do cristal	12
Figura 1. 8: Espectro eletromagnético. Figura extraída da referência ²³	13
Figura 1. 9: Os tipos de espalhamento que podem ocorrer em um experimento Raman.	17
Figura 1. 10: Sistema de classificação BCS.	19
Figura 1. 11: Estrutura molecular planar e tridimensional da Carbamazepina.	20
Figura 1. 12: Estruturamolecular planar e tridimensional da ezetimiba.....	21
Figura 1. 13: Estrutura molecular planar e tridimensional do bisulfato de clopidogrel.	22
Figura 2. 1: Diagrama de distribuição das amostras em uma mistura ternária.	28
Figura 2. 2: Representação da decomposição das matrizes decorrentes do PLS.	31
Figura 3. 1: Caracterização das três formas polimórficas de Carbamazepina. (a) difratogramas das análises de raio-x (DRX) e (b) termogramas das análises de calorimetria diferencial exploratória (DSC). Figuras extraídas da referência⁸¹	44
Figura 3. 2: Espectros Raman para as três formas polimórficas de carbamazepina. Figura extraída da referência ⁸¹	45
Figura 3. 3: Valores reais vs valores preditos pelo modelo para os polimorfos de carbamazepina: a) forma I, b) forma III, c) forma dihidratada.....	48
Figura 4. 1: RMSECV (%) por variáveis latentes para cada modelo.	58

Figura 4. 2: Espectro Raman de amostras de polimorfos puros. Em azul os intervalos selecionados pelo modelo iPLS em cm^{-1} , 160 a 244; 572 a 726 e 1021 a 1162.....	59
Figura 4. 3: Valores reais x valores preditos para CBZ DH (esquerda), CBZ I (meio) e CBZ III (direita). Os valores em porcentagem consideram a massa do polimorfo relacionado a massa total de carbamazepina. (·) amostras de calibração; (+) amostras de validação.	60
Figura 5. 1: Difratogramas das duas estruturas cristalinas de ezetimiba. Em cinza EZT-H e em negro EZT-An.	69
Figura 5. 2: Espectros Raman das formas EZT-H (hidrato) e EZT-An (anidra).....	70
Figura 5. 3: Estruturas cristalinas da ezetimiba. Em a) EZT-An e em b) EZT-H.....	70
Figura 5. 4: Análise termogravimétrica para EZT-H (cinza) e EZT-An (negro).	71
Figura 5. 5: a) Concentração relativa e b) espectros recuperados por MCR-ALS para EZT-An (cinza) e EZT-H (negro) durante a transição de fase do princípio ativo puro.	72
Figura 5. 6: Espectros do comprimido teste retirados nos tempos 0h, 2h, 6h, 12h e 24h, depois de seu preparo.	74
Figura 5. 7: Variáveis latentes vs erro de validação cruzada (RMSECV).	74
Figura 5. 8: Valores reais vs valores preditos pelo modelo PLS. Amostras de calibração (pontos) e validação (quadrados).	76
Figura 6. 1: Difratogramas das três formas de Clopidogrel.....	82
Figura 6. 2: Variáveis latentes vs erro de validação cruzada (RMSECV), para o modelo de espectroscopia Raman.....	83
Figura 6. 3: diagrama de valores reais vs valores preditos para o modelo iPLS/Raman: a) CBS I, b) CBS II e c) CBS amorfo.	85
Figura 6. 4: Espectros Raman para as amostras puras dos polimorfos de clopidogrel.	86
Figura 6. 5: Espectros de infravermelho médio para as amostras puras dos polimorfos de clopidogrel.....	86
Figura 6. 6: diagrama de valores reais vs valores preditos para o modelo iPLS/MIR: a) CBS I, b) CBS II e c) CBS amorfo.	88
Figura 6. 7: Variáveis latentes vs erro de validação cruzada (RMSECV), para o modelo de espectroscopia Infravermelho.	89

RESUMO

APLICAÇÃO DE MÉTODOS QUIMIOMÉTRICOS DE CALIBRAÇÃO E RESOLUÇÃO MULTIVARIADA DE CURVAS EM ESPECTROSCOPIA RAMAN PARA ANÁLISE QUALITATIVA E QUANTITATIVA DE POLIMORFISMO EM CARBAMAZEPINA, CLOPIDOGREL E EZETIMIBA.

Neste trabalho foram utilizadas ferramentas quimiométricas do tipo PLS, iPLS e MCR-ALS para realizar a calibração multivariada de misturas ternárias e binárias dos polimorfos de Carbamazepina, Ezetimiba e Clopidogrel. Inicialmente sintetizaram-se dois polimorfos de Carbamazepina e dois polimorfos de Clopidogrel à partir de seus respectivos polimorfos comerciais, totalizando três polimorfos para cada um desses fármacos. Para carbamazepina sintetizaram-se os polimorfos dihidratado (CBZ DH) e polimorfo I (CBZ I) à partir do polimorfo III (CBZ III), que foram caracterizados por DRX e DSC e espectroscopia Raman. Construiu-se um modelo de calibração do tipo iPLS com os polimorfos. As amostras foram preparadas de acordo com uma mistura ternária. Em cada amostra foram retirados 10 espectros Raman em pontos distintos, posteriormente foi realizada uma média aritmética desses 10 espectros resultando em um espectro médio, com os quais se construíram os modelos de calibração e validação que apresentaram erros de predição de: (CBZ I) 6,2 mg; (CBZ III) 6,8 mg; (CBZ DH) 11,6 mg. Em uma segunda etapa realizou-se o mesmo procedimento, porém as amostras (300 mg) foram preparadas adicionando-se os excipientes (celulose microcristalina, croscamelose sódica, estearato de magnésio e dióxido de silício coloidal) (250 mg) à carbamazepina (50 mg), os erros de predição foram de: (CBZ I) 4,8 mg; (CBZ III) 3,0 mg; (CBZ DH) 0,7 mg. Para o bisulfato de clopidogrel sintetizaram-se os polimorfos II (CBS II) e amorfo (CBS amorfo) à partir do polimorfo I (CBS I, comercial), o modelo de calibração por iPLS foi construído tal como realizado para a carbamazepina, contudo utilizaram-se espectroscopia Raman e infravermelho médio e não se preparam amostras na presença de excipientes. Os erros de predição para o modelo com espectroscopia Raman foi de : (CBS I) 3,2 mg; (CBS II) 5,0 mg; (CBS amorfo) 6,1 mg e para espectroscopia no infravermelho médio foi de: (CBS I) 4,8 mg; (CBS II) 7,4 mg; (CBS amorfo) 6,9 mg. Para a ezetimiba sintetizou-se o hidrato (EZT-H) do polimorfo comercial (EZT-An) e realizou-se uma mistura binária dos dois polimorfos, com a concentração de cada polimorfos variando 10 % em massa em cada amostra, já na presença de seus excipientes. Cada amostra pesa 100 mg, sendo 10 mg de ezetimiba e 90 mg de excipientes (croscamelose sódica, lactose monoidratada, povidona e laurilsulfato de sódio) o mesmo método foi aplicado para a preparação de amostras do conjunto de validação. Construiu-se o modelo de calibração por iPLS com os seguintes erros de predição: (EZT-An) 0,7 mg; (EZT-H) 0,6 mg. Preparou-se uma nova amostra apenas com EZT-An e seus excipientes que foi embalada à vácuo em um recipiente de polietileno, realizou-se um monitoramento durante 24 horas onde viu-se que nesse período a hidratação da Ezetimiba já era de 72%, por conta da umidade de seus excipientes.

ABSTRACT

APPLICATION OF CHEMOMETRIC METHODS OF CALIBRATION AND MULTIVARIATE CURVE RESOLUTION IN RAMAN SPECTROSCOPY TO QUALITATIVE AND QUANTITATIVE OF POLYMORPHISM IN CARBAMAZEPINE, CLOPIDOGREL E EZETIMIBE.

In this work were used chemometric tools like PLS, iPLS to perform multivariate calibration of ternary and binary mixtures of polymorphs of carbamazepine, ezetimibe and Clopidogrel. Initially were synthesized two polymorphs of carbamazepine and two polymorphs of clopidogrel from its respective commercial polymorphs, totaling three polymorphs for each of these drugs. For carbamazepine were synthesized the dihydrate polymorphs (CBZ DH) and polymorph I (CBZ I) from the Polymorph III (CBZ III), which were characterized by DSC and XRD, and Raman spectroscopy. Initially an iPLS model was built with the polymorphs. The samples were prepared according to a ternary mixture, totaling 10 samples for a set of calibration and a further 5 to a set of validation. At each sample was collected 10 Raman spectra at different points, subsequently an arithmetic average of the 10 spectra was calculated, resulting in an average spectrum with which is built the model calibration and validation presenting prediction error: (CBZ I) 6.2 mg; (CBZ III) 6.8 mg; (CBZ DH) 11.6 mg. In a second step the same procedure was conducted, but samples (300 mg) were in the presence of its excipients (microcrystalline cellulose, sodium croscarmellose, magnesium stearate and colloidal silicon dioxide). The samples were prepared by adding (250 mg), carbamazepine (50 mg), prediction errors were: (CBZ I) 4.8 mg; (CBZ III) 3.0 mg; (CBZ DH) 0.7 mg. For bisulfate Clopidogrel were synthesized polymorphs II (CBS II) and amorphous (amorphous CBS) from polymorph I (CBS I, commercial), the iPLS calibration model was constructed as done for carbamazepine, however were used mid-infrared and Raman spectroscopy and the samples were not prepared in the presence of its excipients. Prediction errors for the model with Raman spectroscopy was: (CBS I) 3.2 mg; (CBS II) 5.0 mg; (Amorphous CBS) 6.1 mg and mid-infrared spectroscopy was: (CBS I) 4.8 mg; (CBS II) 7.4 mg; (Amorphous CBS) 6.9 mg. For ezetimibe was synthesized the hydrate (EZT-H) from the commercial polymorph (EZT-An) and held a binary mixture of the two polymorphs, with the concentration of each polymorphs ranging 10% by weight in each sample, since in the presence of its excipients. Each sample weight 100 mg, with 10 mg of ezetimibe and 90 mg of excipients (croscarmellose sodium, lactose monohydrate, povidone and sodium lauryl sulphate), the same method was applied for the preparation of the samples validation set. The calibration model was built by iPLS with the following prediction errors: (EZT-An) 0.7 mg; (EZT-H) 0.6 mg. A new sample was prepared only with EZT-An and the excipients which was vacuum packed in a polyethylene container, carried out a monitoring for 24 hours where it was seen that in this period the hydration of Ezetmiba was already 72% due to the moisture of the excipients.

SUMÁRIO

1. Introdução.....	2
1.1 Considerações Gerais.....	2
1.2 Polimorfismo em fármacos e suas implicações na indústria farmacêutica.....	4
1.3 Técnicas analíticas utilizadas para identificação de polimorfismo.....	6
1.3.1 Análises térmicas.....	6
1.3.2 Difração de raio-x.....	8
1.4 Análises em nível molecular.....	12
1.4.1 Espectroscopia no Infravermelho.....	13
1.4.2 Espectroscopia Raman.....	16
1.5 Os fármacos e suas características.....	19
1.5.1 Carbamazepina.....	20
1.5.2 Ezetimiba.....	21
1.5.3 Bisulfato de Clopidogrel.....	22
1.6 A quantificação de polimorfos e a utilização de ferramentas quimiométricas.....	22
2. Métodos quimiométricos.....	27
2.1 Planejamento experimental.....	27
2.2 Regressão por mínimos quadrados parciais (PLS).....	30
2.2.1 PLS em intervalos de variáveis (iPLS).....	33
2.3 MCR-ALS, resolução multivariada de curvas por mínimos quadrados alternados...34	
2.4 Rotinas utilizadas.....	37
3. Quantificação simultânea de três polimorfos de carbamazepina utilizando espectroscopia Raman e análise multivariada.*	39
3.1 Introdução e objetivos.....	39
3.2 Materiais e métodos.....	40
3.3 Resultados e discussão.....	42
3.4 Conclusões.....	49

4. Quantificação simultânea de três formas polimórficas de carbamazepina na presença de excipientes utilizando espectroscopia Raman.	51
4.1. Introdução	51
4.2. Materiais e métodos.	54
4.2.1. Síntese dos polimorfos.....	54
4.2.2. Caracterização dos polimorfos.	55
4.2.3. Preparação dos comprimidos.....	55
4.3. Aquisição e tratamento dos dados.....	56
4.4. Resultados e discussão.....	57
4.5. Conclusões.....	60
5. Monitoramento da formação do monohidrato de Ezetimiba, após embalamento, causado pela umidade dos excipientes, por meio de espectroscopia Raman e ferramentas quimiométricas.....	63
5.1. Introdução e objetivos.....	63
5.2. Materias e métodos.	65
5.2.1. Reagentes.....	65
5.2.2. Síntese da EZT-H.	65
5.2.3. Caracterização da EZT-H, EZT-An e dos excipientes.....	66
5.2.4. Monitoramento da EZT-An pura por espectroscopia Raman e MCR-ALS.	66
5.2.5. Monitoramento da hidratação da EZT-An promovida pela umidade dos excipientes por meio de espectroscopia Raman e PLS.	67
5.3. Resultados e discussão.....	69
5.3.1. Caracterização da ezetimiba.	69
5.3.2. Monitoramento da hidratação da EZT-An por espectroscopia Raman e MCR-ALS. 72	
5.3.3. monitoramento da hidratação da EZT-An, via espectroscopia Raman e PLS, promovida pela umidade dos excipientes.....	73
5.4. Conclusão.....	76

6. Determinação de três polimorfos de clopidogrel por meio de espectroscopia Raman e no infravermelho aliada à calibração multivariada.	79
6.1. Introdução e objetivos.....	79
6.2. Materiais e métodos.....	79
6.2.1. Síntese do CBS amorfo.....	79
6.2.2. Síntese de CBS II.....	80
6.2.3. Preparação das misturas polimórficas e amostras.	80
6.2.4. Instrumentação utilizada.	80
6.2.5. Análise multivariada.	81
6.3. Resultados e discussão.....	82
6.4. Conclusão.....	89
7. Perspectivas referentes aos resultados encontrados.	91
8. Referências bibliográficas.....	92

CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO

1. Introdução.

1.1 Considerações Gerais.

A formulação de fármacos em estado sólido (comprimidos) é constituída de excipientes e princípio ativo. Os excipientes possuem diversas funções que podem ser resumidas como de proteção do princípio ativo e liberação do mesmo em local adequado no organismo, garantindo o desempenho terapêutico e otimizando o desempenho do fármaco¹. Contudo, as formulações podem sofrer diversas alterações no processo de produção e estocagem². Dentre as possíveis alterações está a mudança de hábito cristalino do princípio ativo, também conhecido por polimorfismo e solvatomorfismo.

Dentre as definições de polimorfismo a que está descrita no trabalho de Bauer *et.al.*³ é uma das mais simples e completas, segundo esse trabalho polimorfismo é a habilidade de um composto existir em mais de uma forma cristalina com diferentes parâmetros de célula. Sendo assim, princípios ativos de fármacos podem sofrer alterações polimórficas levando a mudança de algumas propriedades físicas e químicas como solubilidade aparente, taxa de dissolução, propriedades ópticas e mecânicas, ponto de fusão, densidade entre outras⁴. Dentre as propriedades que podem sofrer mudança, a taxa de dissolução é a mais relevante uma vez que é alterada a velocidade com que o fármaco é liberado no organismo (biodisponibilidade).

A relevância do polimorfismo em fármacos foi inicialmente relatada por Haleblan e McCrone⁵ em 1969, contudo apenas no ano de 1998 a indústria farmacêutica enfrentou um grande problema relacionado a formação de polimorfismo em princípio ativo. A companhia Abbott®, fabricante do fármaco Norvir (antirretroviral) utilizado por portadores de HIV, relatou que uma mudança na estrutura cristalina do princípio ativo estava afetando sua biodisponibilidade^{3,6}. Apenas no ano de 2000 a companhia Abbott® foi certificada a retornar com a produção dos comprimidos Norvir. À época, a venda anual de Norvir estava estipulada em 250 milhões de dólares, deixando de arrecadar meio bilhão de dólares, apenas em vendas. Uma ilustração de como o arranjo cristalino se modificou no caso do Ritonavir pode ser visto na Figura 1. 1 e na Figura 1. 2

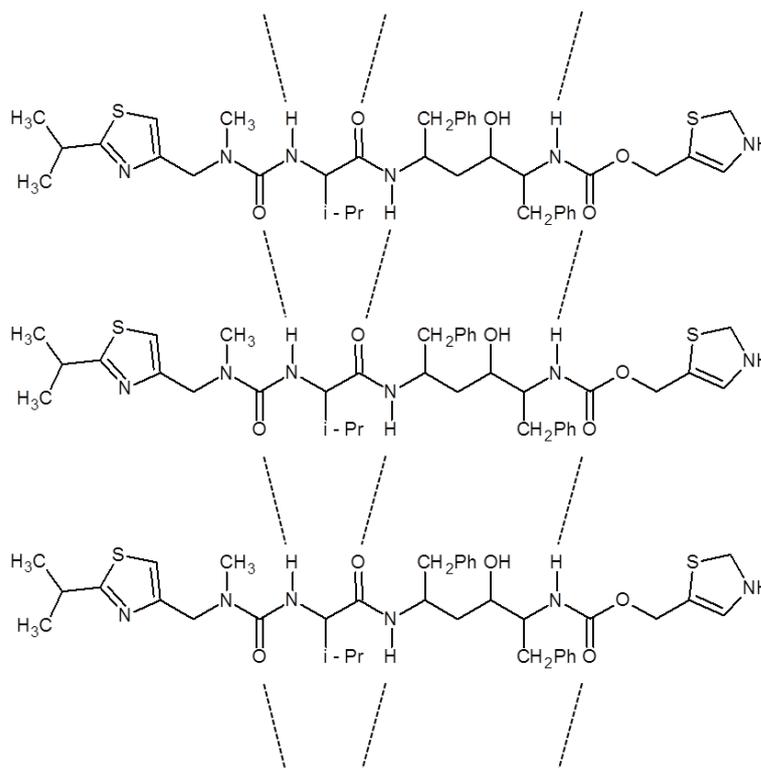


Figura 1. 1: Forma I (taxa de dissolução mais elevada) do princípio ativo Ritonavir. Essa figura não representa a conformação tridimensional da molécula

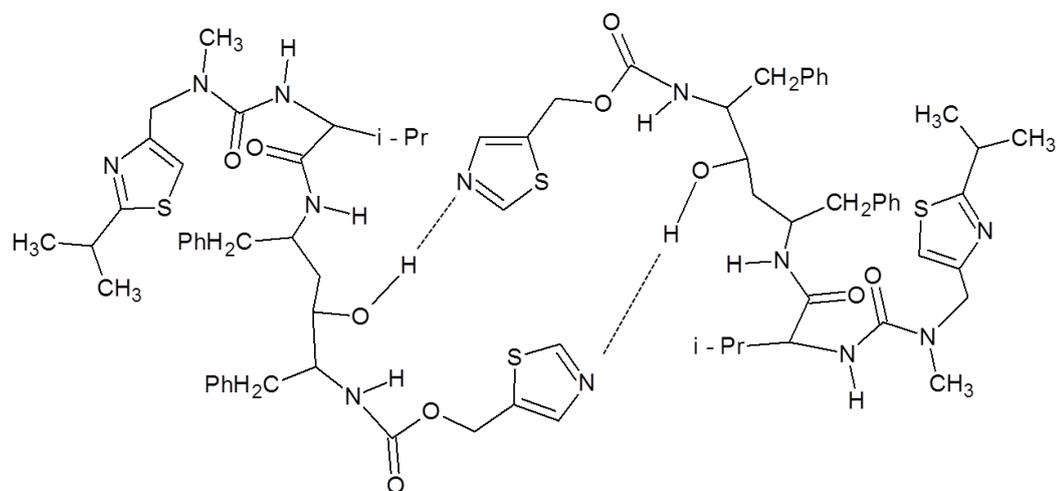


Figura 1. 2: Forma II (taxa de dissolução mais baixa) do princípio ativo Ritonavir, termodinamicamente mais estável. Essa figura não representa a estrutura tridimensional da molécula.

Depois desse episódio a agência de regulamentação norte americana FDA (*Food and Drug Administration*) redobrou seus esforços no que diz respeito a ocorrência de

polimorfismo em fármacos, sugerindo uma série de testes para a realização do controle de qualidade de fármaco⁴.

1.2 Polimorfismo em fármacos e suas implicações na indústria farmacêutica.

Como relatado anteriormente, apenas em 1998 houve um caso de polimorfismo em fármaco capaz de chamar a atenção ao impacto que este fenômeno pode causar nas propriedades físicas e químicas de um fármaco. Desde então um grande número de artigos científicos começou a tratar do tema, propondo maneiras de identificar e quantificar polimorfos em comprimidos. Segundo Stahly⁷ entre 80-90% dos compostos orgânicos podem sofrer alterações cristalinas, que ocorrem durante o processo de fabricação, embalagem e estocagem, devido à umidade presente no meio em que o princípio ativo se encontra, ou ainda devido à prensagem necessária para formar o comprimido, dentre outros fatores.

O estudo de polimorfismo em fármacos é particularmente importante na etapa de desenvolvimento do fármaco. Diferentes estruturas cristalinas possuirão diferentes propriedades físicas e químicas e o estudo dos possíveis polimorfos para um determinado princípio ativo se faz necessário para escolher o melhor polimorfo que atenda a uma determinada necessidade. Normalmente, o polimorfo preferido para a linha de produção é o termodinamicamente mais estável, uma vez que não sofrerá mais mudanças durante o processo de produção embalagem e estocagem, contudo este mesmo polimorfo tende ser pouco menos solúvel, apresentando menor biodisponibilidade⁸.

A FDA classifica como polimorfos as diferentes formas cristalinas de uma mesma molécula, os sólidos amorfos, bem como os solvatos e os hidratos⁴, embora estes sejam melhor definidos pelo termo solvatomorfos. A indústria farmacêutica tem especial interesse nos sólidos amorfos, isto porque a dissolução deste nos fluidos orgânicos é facilitada por seu estado energético (estado energético maior do que quando em estrutura cristalina). Dessa forma não há gasto energético necessário para o rompimento de uma estrutura cristalina e a taxa de solubilidade torna-se maior. Contudo, sólidos amorfos são instáveis e podem facilmente sofrer transição para uma fase cristalina, devido a sua instabilidade termodinâmica. O que determina essa transição é a mobilidade das moléculas no sólido, se o sólido estiver acima da temperatura de transição vítrea (T_g) há mobilidade suficiente para que a transição ocorra, abaixo da T_g a transição é dificultada⁹. Percebe-se que o uso de amorfos como princípio ativo exigiria uma série de recursos na linha de produção, estocagem e transporte o

que encareceria o produto final. Há ainda uma série de outras possibilidades do surgimento de polimorfos como os solvatos ou hidratos, muito comuns em produtos finais.

Devido às condições de produção de um princípio ativo e posterior produção do comprimido, existe uma real probabilidade de transição polimórfica durante o processo de produção. Dessa forma, se faz necessário o desenvolvimento de métodos analíticos que forneçam rápido resultado, afim de se realizar análise na linha de produção em tempo hábil para uma intervenção caso a transição polimórfica esteja ocorrendo.

Do ponto de vista econômico e legal é necessário citar a quebra de patente de determinados princípios ativos. Em alguns países como Brasil, Índia e África do Sul houve uma pressão por parte governamental fazendo que algumas patentes fossem quebradas e esses princípios ativos passassem a ser produzidos nesses países. Esse fato fez com que ocorresse um fortalecimento da indústria farmacêutica nesses países, consolidando a indústria dos fármacos genéricos¹⁰.

O estudo de polimorfos veio se tornar relevante recentemente sendo que não era necessária a descrição de polimorfos em patentes. Contudo, devido aos fatos anteriormente citados, os polimorfos passaram a ser patenteados e os direitos de propriedade intelectual ainda se encontram protegidos. Deste fato surgem inúmeras implicações, pois em muitos casos a patente do princípio ativo expirou e o mesmo pode ser processado por outras companhias farmacêuticas, porém a patente do polimorfo está em vigor. Isso implica que o princípio ativo deve ser comercializado com hábito cristalino diferente do que se encontra patentado. Não são raros os casos em que apenas um polimorfo do princípio ativo exiba atividade terapêutica, sendo que outros polimorfos apresentam diferentes taxas de dissolução, sendo inativos ou tóxicos, como é o caso do anti-helmíntico mebendazol¹¹. Vê-se que o estudo de polimorfos, bem como de técnicas analíticas que possam quantificá-los é de interesse da indústria farmacêutica. Devido ao pouco tempo das questões sobre o polimorfismo na indústria farmacêutica brasileira, posteriores ao ano de 2000, e de sua determinação em produtos finais, ainda não há muitos estudos que lidem com o problema de maneira satisfatória. A ANVISA sugere as técnicas analíticas citadas pela FDA, mas ainda não escolheu um método padrão para quantificação de polimorfismo em fármaco¹².

1.3 Técnicas analíticas utilizadas para identificação de polimorfismo.

Devido a grande possibilidade de alteração polimórfica durante os processos de fabricação dos comprimidos aFDA⁴ sugeriu uma série de técnicas analíticas para controle de qualidade do processo de produção, sendo elas: Difração de Raio-X (DRX), microscopia, análises térmicas (e.g. calorimetria diferencial de varredura e termogravimetria) e análises espectroscópicas (e.g. Infravermelho, Raman, Ressonância Magnética Nuclear em estado sólido).

Brittain¹³ fornece em seu artigo uma abordagem das técnicas analíticas que podem ser utilizadas na análise de fármacos e as divide em três partes: análises em nível molecular, análises em nível de partículas e análises em nível do *bulk*.

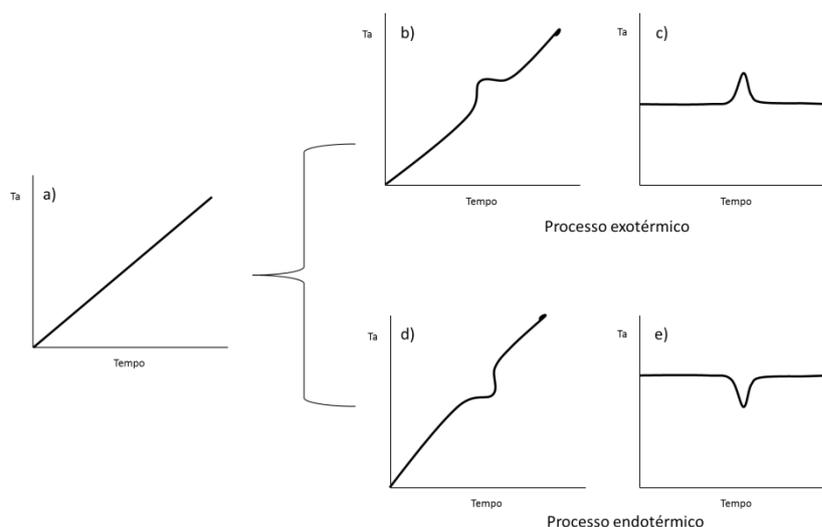


Figura 1. 3:a). Quando não ocorre nenhum evento térmico, b) quando ocorre processo exotérmico, c) processo exotérmico para sistema térmico diferencial, d) quando ocorre processo endotérmico, e) quando ocorre processo endotérmico para sistema térmico diferencial. Figura extraída da referência¹⁵

1.3.1 Análises térmicas.

Análises térmicas são comumente definidas como sendo métodos onde uma determinada propriedade do analito é determinada por meio da aplicação externa de temperatura¹³. O conjunto de técnicas que compõe as análises térmicas são empregadas para determinação de pureza do analito, polimorfismo, solvatação, degradação e compatibilidade com excipientes¹⁴. Análises térmicas geralmente são utilizadas para monitorar processos endotérmicos (fusão, sublimação, vaporização desolvatação, transição entre fases sólidas), bem como processos exotérmicos (cristalização e decomposição oxidativa).

Análises térmicas funcionam sob o princípio de transferência de calor a uma determinada taxa a amostra. No caso do DSC (do inglês *differential scanning calorimetry*), essa transferência de calor é realizada para dois módulos distintos, em um deles há uma amostra padrão e em outro a amostra que se deseja fazer a análise térmica, a diferença de condução térmica entre os dois módulos é referente ao processo endotérmico ou exotérmico ocorrido na amostra, que é registrado em forma de um termograma¹⁵. No DTA (do inglês *Differential Thermal Analysis*), avalia-se a diferença de temperatura entre a amostra e a referência, sendo os diferentes termogramas referentes aos possíveis processos termodinâmicos que ocorrem numa análise térmica descritos nas Figura 1.3 c) e e).

Dentre as técnicas de análise térmica mais utilizadas estão a análise térmica diferencial (DTA), a calorimetria diferencial exploratória (DSC), e a análise termogravimétrica (TGA, do inglês *thermogravimetric analysis*)^{13,14}. Análises de DTA representam uma evolução das técnicas de determinação do ponto de fusão. Em DTA a diferença de temperatura entre a amostra e a referência é monitorada, então registra-se um termograma de variação de temperatura (ΔT) versus tempo. Caso não haja diferença de temperatura entre a temperatura da amostra e a referência, obtêm-se uma reta, indicativo de que não está ocorrendo nenhum processo térmico. Contudo, quando há algum evento exotérmico se observará um pico, como na (Figura 1. 3-b), bem como um evento endotérmico resultará em um pico em sentido oposto (Figura 1. 3-d).

O DSC mede a variação de entalpia que ocorre entre a amostra e a referência. Os primeiros instrumentos mantinham, através de aquecedores elétricos individuais, a mesma temperatura entre a referência e a amostra e a potência consumida pelos aquecedores era relacionada à energia térmica envolvida no processo exotérmico ou endotérmico. Posteriormente desenvolveu-se um outro tipo de instrumento onde a referência e a amostra são submetidas ao mesmo fluxo de calor e a temperatura da referência e da amostra é monitorada por meio de uma placa metálica com alta condutividade térmica na qual ambas, referência e amostra, estão posicionadas. Os eventos endotérmicos ou exotérmicos ocorridos na amostra são monitorados por conta da variação de temperatura existente entre a amostra e a referência^{13,15}.

Já a TGA é uma técnica mais simples onde há uma balança que mede a mudança de massa decorrente de uma varredura de temperatura¹³.

O emprego das análises térmicas descritas em fármacos é amplamente conhecido e difundido, sendo uma das principais técnicas analíticas a serem utilizadas para análises de fármacos. Um estudo realizado por Chieng *et. al.*¹⁶ revela que em 90% dos estudos realizados em formulações farmacêuticas em estado sólido utiliza-se ao menos duas técnicas analíticas, sendo elas DSC ou DRX, associadas com técnicas espectroscópicas como Infravermelho ou Raman. Dentre as técnicas de análise térmica, DSC é a mais utilizada para estudos físico-químicos que envolvem transição de fase promovida por temperatura (i.e determinação da relação enantiotrópica/ monotrópica entre formas polimórficas)^{17,18}. Contudo, a interpretação do termograma torna-se muito difícil quando há mais de dois eventos térmicos ocorrendo de maneira sobreposta ou em temperaturas muito próximas¹⁹. Logo, a diferenciação de polimorfos por meio de DSC pode ser falha e necessitar de outra técnica analítica de apoio.

1.3.2 Difração de raio-x

Dentre as técnicas analíticas utilizadas para determinar estruturas cristalinas a difração de raio-x é certamente a mais utilizada. No estudo de transformações polimórficas o uso de DRX associado a uma técnica espectroscópica (Infravermelho ou Raman) é a escolha mais comum devido ao padrão único do difratograma/espectro que essas técnicas fornecem a cerca do polimorfo¹⁶.

O fenômeno de raio-x foi descoberto por Wilhem Röntgen em 1895. Os raio-x possuem comprimento de onda da ordem de 0,1 nm, mesma ordem de grandeza da distância interatômica em cristais. A interação entre os raios-x e um cristal causa um padrão de difração que pode ser compreendido segundo a lei de Bragg. Essa lei foi desenvolvida considerando os fenômenos de interação entre a onda (raio-x) e a matéria (retículo cristalino).

1.3.2.1 Lei de Bragg.

Como mencionado anteriormente os raios-x são uma forma de radiação eletromagnética de alta energia e baixo comprimentos de onda, da ordem de 0,5 – 2,5 Å, mesma ordem do espaçamento atômico nos sólidos. Quando um feixe de raio-x incide sobre uma material sólido, uma fração desse feixe será dispersa em todas as direções pelos elétrons que estão associados a cada átomo ou íon que se encontra na trajetória do feixe. Observando a Figura 1. 4 pode-se observar um esquema que exemplifica como pode ocorrer o fenômeno de difração. Cabe aqui frisar que ondas eletromagnéticas podem sofrer interações construtivas

quando suas amplitudes são da mesma ordem de grandeza e seus máximos estão em fase. Do contrário as interações serão destrutivas e as ondas se anularão. Logo, em um evento de difração, apenas as ondas difratadas que interagem de maneira construtiva criam um padrão de reflexão de onde se pode retirar informações a cerca do sólido. Ainda considerando a Figura 1. 4, vê-se um feixe incidindo sobre uma molécula, átomo ou íon no primeiro plano (A) de uma face do cristal e um segundo feixe incidindo da mesma maneira, porém no terceiro plano (C). Considerando que os feixes incidentes tem o mesmo comprimento de onda (monocromático) λ e que o feixe incidente em R sofrerá uma difração e percorrerá um caminho maior que o feixe difratado em O, haverá interação construtiva das ondas difratadas se a distância entre os plano A e C forem um número inteiro do comprimento de onda incidente. Logo pode-se dizer que a diferença de caminho ótico(δ) entre os dois planos é dada por:

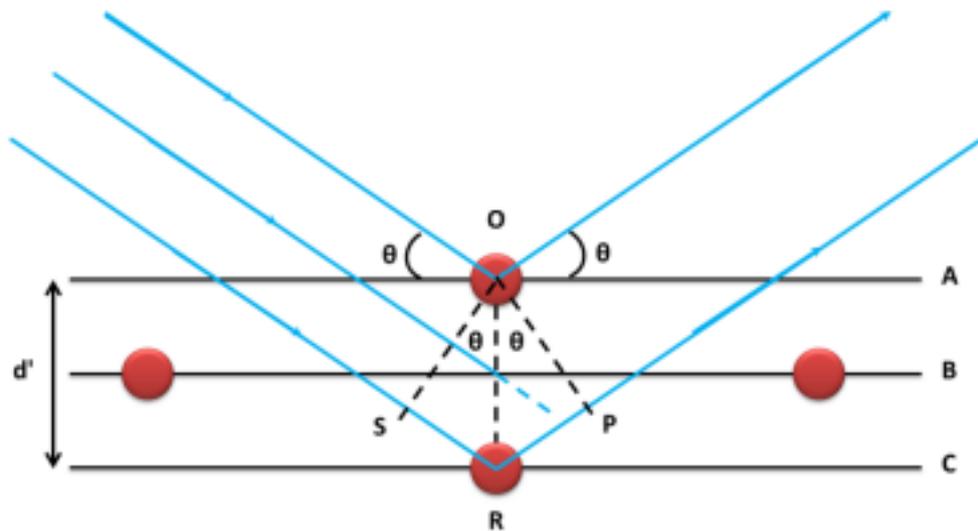


Figura 1. 4: Plano de difração de um cristal onde os raios-x estão sendo incididos e difratados. Figura extraída da referência²⁰

$$n\lambda = \delta \quad (1.1)$$

Na Figura 1. 4 vê-se os ângulos θ de incidência e difração dos raios bem como a distância d' entre os planos A e C. A distância entre os caminhos óticos dos dois feixes é dada por:

$$\delta = \overline{SR} + \overline{RP} = 2\overline{RP} \quad (1.2)$$

Utilizando as equações (1.1) e (1.2), e as relações geométricas obtêm-se a seguinte dedução:

$$\frac{\delta}{2} = \overline{OR} \operatorname{sen}\theta \quad (1.3)$$

$$\delta = 2d' \operatorname{sen}\theta \quad (1.4)$$

$$n\lambda = 2d' \operatorname{sen}\theta \quad (1.5)$$

A equação (1.5) é conhecida como Lei de Bragg, através dessa relação é possível estabelecer os parâmetros da célula, uma vez que a distância entre os planos d' está em função dos índices de Miller (h, k, l). Estes índices de Miller são números que descrevem a distribuição dos planos num cristal²¹.

A lei de Bragg por si só não descreve a estrutura de um cristal, sua aplicação estará associada as possíveis maneiras que um retículo cristalino poderá difratar radiação (raio-x) à partir da incidência de um feixe monocromático de raios-x. Os padrões de difração estarão associados ao arranjo cristalino do sólido. Auguste Bravais demonstrou em 1848 que apenas 14 estruturas eram possíveis, daí as estruturas receberem o nome de estruturas (ou retículos) de Bravais²¹. Figura 1. 5

Como pode-se observar na Figura 1. 4 a distância entre os possíveis planos de um cristal é simbolizado pelas letras **a, b** e **c**, para o caso de estruturas cúbicas. Estas letras são os parâmetros de rede, em estruturas cúbicas possuem a relação descrita na equação (1.6). Essa relação permite o cálculo das distâncias entre os planos de um cristal e dessa forma elucidada-se a estrutura do cristal.

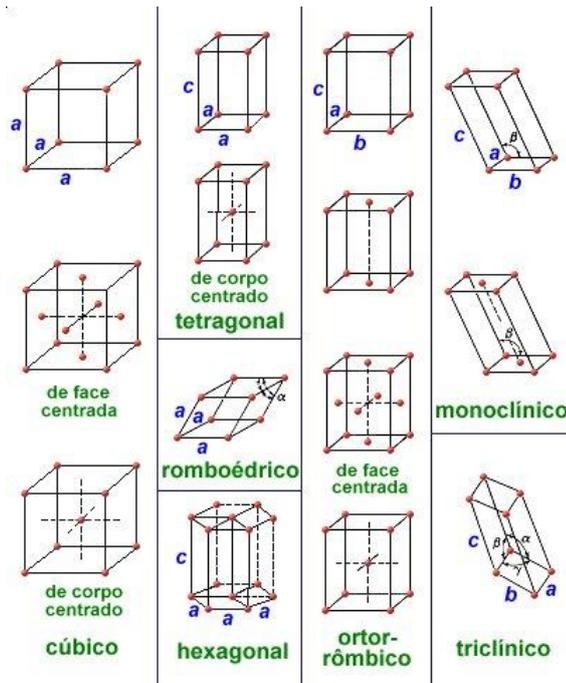


Figura 1. 5: Os 14 arranjos cristalinos possíveis para um sólido (redes de Bravais).

$$d_{h,k,l} = \frac{a_0}{\sqrt{h^2 + k^2 + l^2}} \quad (1.6)$$

O instrumento de difração de raio-x tem a configuração vista na Figura 1. 6. Os raios são difratados num ângulo 2θ e atingem o detector. De fato a difração ocorre em todas as direções e forma um cone de difração, cada plano do cristal reflete um cone diferente e a variação no ângulo de incidência da radiação na amostra faz com que apareça vários padrões de difração.

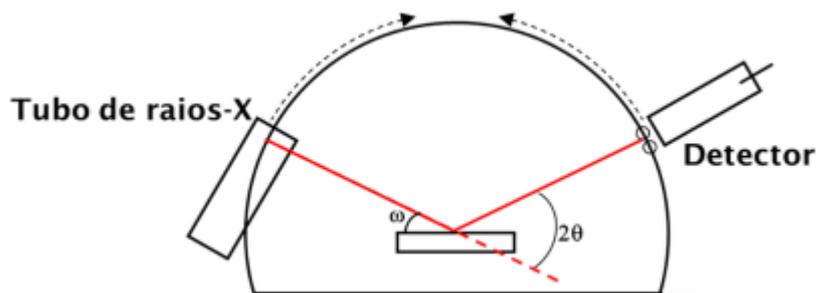


Figura 1. 6: Esquema de um instrumento de Difração de raio-x. Figura extraída da referência²⁰.

A difração dos raios-x é tridimensional, porém o detector é bidimensional, logo o padrão que se observa no detector é algo parecido com o que se vê na Figura 1. 7, onde cada linha à esquerda e à direita é referente à difração de um determinado plano cristalográfico.



Figura 1. 7: Sensibilização do detector pelas linhas de difração referente aos planos do cristal

Dessa forma a cada valor de ângulo 2θ têm-se um padrão de difração. Para que haja uma varredura no ângulo de incidência dos raios-x é necessário que a fonte de raio-x se mova, ou ainda que a fonte fique fixa e que o suporte da amostra se mova, possibilitando a varredura de ângulo da amostra. Existem outras relações geométricas entre os parâmetros **a, b e c** e os índices de Miller que permitem a elucidação completa da estrutura do cristal.

1.4 Análises em nível molecular.

Como definido por Brittain¹³, análise em nível molecular é aquela em que se obtêm informação das propriedades do material utilizando apenas um pequeno conjunto de moléculas. As técnicas utilizadas em nível molecular são em sua maioria espectroscópicas e exigem mínimos requisitos para análise.

A espectroscopia se baseia na interação entre a radiação e a matéria²². O espectro eletromagnético abrange comprimentos de onda que vão desde 10^7 m até 10^{-15} m, ou seja, varia de ondas de baixa energia, abaixo da região do infravermelho até ondas de alta energia, acima dos raios gama. Na Figura 1. 8 pode-se observar que o espectro eletromagnético está dividido em regiões onde se observa alguns fenômenos conhecidos, como as ondas de rádio, ondas de microondas relacionadas a rotação de moléculas, e assim por diante.

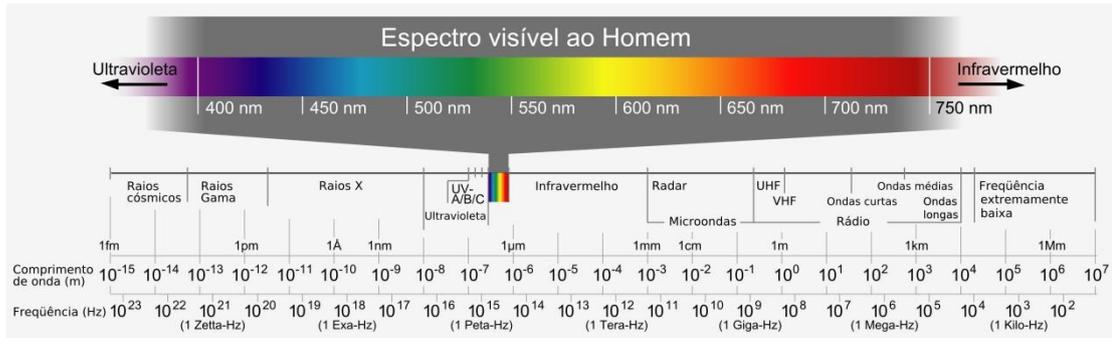


Figura 1. 8: Espectro eletromagnético. Figura extraída da referência²³.

Neste estudo utilizaram-se duas técnicas em nível molecular: Infravermelho Médio e Raman, que compreendem uma região de energia referente aos modos de vibração das moléculas.

1.4.1 Espectroscopia no Infravermelho.

A região eletromagnética no infravermelho compreende os comprimentos de onda descritos na Tabela 1. 1.

Tabela 1. 1: Comprimentos de onda correspondentes à região do infravermelho.

Região	Intervalo de número de onda ($\tilde{\nu}$), cm^{-1}	Região em comprimento de onda (λ), μm .	Região de frequência (ν), Hz.
Próximo (NIR)	12800 - 4000	0,78 – 2,5	$3,8 \times 10^{14} - 1,2 \times 10^{14}$
Médio (MID)	4000 - 400	2,5 – 25	$1,2 \times 10^{14} - 3,0 \times 10^{12}$
Distante (FAR)	400 - 10	25 - 1000	$3,0 \times 10^{12} - 3,0 \times 10^{11}$

As energias associadas aos modos de vibração fundamental das moléculas estão na região do Infravermelho médio^{24,25}.

As técnicas de espectroscopia se baseiam na interação entre a luz (ondas eletromagnéticas) e a matéria. Como a energizados modos de vibração normais de uma molécula se encontram na região do infravermelho médio, uma molécula atingida por um feixe de ondas eletromagnéticas nessa faixa de energia, irá absorvê-la causando uma mudança

nos seus modos de vibração. Para que uma molécula absorva radiação infravermelha é necessário que a mesma possua momento de dipolo, dessa forma o campo elétrico da radiação irá interagir com o dipolo elétrico da molécula alterando seus modos de vibração, e assim, a molécula vibra como se fosse um oscilador harmônico diatômico. Tendo como base o modelo de oscilador harmônico é possível calcular as energias dos modos de vibração das moléculas. No modelo do oscilador harmônico as ligações químicas são consideradas como molas e os átomos podem ser considerados como bolas presas por essas molas, logo a oscilação desse conjunto pode ser descrita pela lei de Hooke²⁶.

$$\nu = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{K_f}{\mu}} \quad (1.7)$$

Onde ν é a frequência de vibração do modo analisado, K_f é constante de força da ligação e μ é a massa reduzida de dois átomos de massa m_1 e m_2

$$\mu = \frac{m_1 m_2}{m_1 + m_2} \quad (1.8)$$

O modelo clássico de molas funciona muito bem para moléculas diatômicas e moléculas mais simples, contudo para moléculas mais complexas é necessário realizar uma expansão desse modelo fazendo as considerações quânticas necessárias afim de que o modelo atenda aos modos de vibrações de moléculas mais complexas. Uma diferença básica que ocorre entre o modelo clássico e o modelo quântico é que no primeiro as energias de transição variam continuamente, o que não ocorre em moléculas com energia quantizada. Sabe-se que os modos de vibração de uma molécula são limitados e dependem do grau de liberdade da molécula. Para maior aprofundamento pode-se consultar a referência²⁶.

Do ponto de vista analítico é necessário saber as diferentes características referentes as três regiões do infravermelho para que se possa realizar uma análise com informações relevantes. A espectroscopia no infravermelho próximo extrai informações dos modos de vibração harmônica e seus sobretons, e essas bandas são em sua maioria referentes as ligações de hidrogênio (OH, NH, CH). As bandas possuem sinal muito fraco quando

comparado as outras regiões do infravermelho²⁵ e devido à natureza do conjunto de dados analisados por NIR o tratamento dos mesmos está majoritariamente associado ao uso de quimiometria e encontram-se aplicações para análises quantitativas, principalmente na indústria alimentícia^{25,27,28}.

O infravermelho distante tem por característica propiciar vibrações anarmônicas que incluem os modos de torção simétricos e assimétricos de moléculas orgânicas pequenas e de organometálicos²⁹, contudo não se encontram muitas aplicações dessa técnica na literatura.

No infravermelho médio existe uma faixa espectral (1200 cm^{-1} a 700 cm^{-1}) reconhecida como a faixa de *impressão digital* da análise. Nessa região os picos são muito característicos para cada amostra, uma pequena alteração na estrutura da molécula leva a grandes mudanças no espectro³⁰. Por esse motivo o infravermelho médio é utilizado para fins qualitativos e quantitativos, diferentemente do infravermelho próximo que não pode ter suas bandas relacionadas a somente um modo de vibração característico de alguma parte da molécula pois seus modos de vibração são sobrepostos no espectro.

De um modo geral a espectroscopia no infravermelho é tida como uma técnica ideal para análise em sólidos devido aos avanços que a técnica obteve depois dos anos 50. Instrumentos mais antigos são dispersivos, ou seja, a amostra precisa de um longo tempo de exposição à fonte de radiação para que se tenha um espectro com boa relação sinal/ruído. À partir de 1970 surgiram os primeiros instrumentos de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR, do inglês *Fourier transform infrared*)³¹. Nestes instrumentos há um dispositivo, interferômetro de Michaelson, que faz com que todos os comprimentos de ondas da região analisada sejam incididos rapidamente sobre a amostra, gerando padrões de difração que são decodificados, como absorção em um dado comprimento de onda, pela transformada de Fourier^{31,32}.

Outros avanços também surgiram na parte de preparação de amostras. A técnica mais antiga de preparação de amostras para análise de infravermelho envolve a preparação de uma pequena parte da amostra (2% em massa) com KBr, homogeneizada em um almofariz e comprimida a altas pressões (10.000 p.s.i) até que a amostra se torne uma pastilha vitrificada por onde passará o laser de infravermelho. Pode-se perceber que essa técnica de preparação de amostra é totalmente equivocada para o objetivo de se analisar polimorfismo já que a etapa de homogeneização da amostra e pressurização para formação da

pastilha podem induzir uma transformação polimórfica. Posteriormente surgiram as técnicas de reflexão difusa (DRIFTS, do inglês *diffuse reflectance infrared Fourier transform spectroscopy*), na qual o analito em pó é irradiado pelo feixe infravermelho e radiação incidente será absorvida, refletida e difratada pelas partículas da amostra e somente a parte difratada conterá informação sobre a amostra. O DRIFTS é uma boa técnica quando utilizada para análise de amostras puras que contenham tamanhos de partícula homogêneos, uma vez que a reflectância da amostra dependerá do tamanho das partículas. Para análise quantitativa de misturas entre princípio ativo e excipientes, com tamanho de partículas diversos, a técnica pode não fornecer bons resultados³³.

Um outro avanço nos instrumentos foi a criação de um dispositivo de reflectância total atenuada (ATR, do inglês, *attenuated total reflection*) que é um cristal de ZnSe (Seleneto de Zinco), na maioria dos casos, apresentando alto índice de refração. O uso desse dispositivo consiste num conjunto de espelhos que direciona o feixe de raios infravermelhos para a superfície do cristal, em seguida esse feixe é refletido pelo cristal e redirecionado ao detector por um outro conjunto de espelhos. A amostra é colocada na superfície desse cristal, logo a amostra é irradiada pela parte do feixe que foi anteriormente atenuada pela superfície do cristal³². O ATR oferece a vantagem de não necessitar de preparo da amostra e ser não destrutiva, porém só obtém um espectro da superfície do material.

1.4.2 Espectroscopia Raman.

A espectroscopia Raman foi descoberta por Chandrasekara Venkata Raman em 1928 e desde então os instrumentos dessa técnica analítica vem se desenvolvendo constantemente³⁴. Devido ao desenvolvimento da fotônica e da optoeletrônica a instrumentação se adequou rapidamente às necessidades de vários tipos de análises, tendo um grande aumento do número de aplicações³⁴.

Quando a luz interage com a matéria é comum que ocorra absorção da luz, como no caso da espectroscopia no infravermelho, e que também ocorra espalhamento que é o caso da espectroscopia Raman. No espalhamento de fótons a luz interage com as moléculas causando uma mudança na polarizabilidade da mesma em virtude da mudança dos estados vibracionais e rotacionais, sendo a molécula homonuclear ou heteronuclear³⁵. O espalhamento pode se dar de duas maneira, espalhamento elástico ou inelástico e o espalhamento inelástico pode ainda ser de maior ou menor energia do que a energia da fonte de luz incidente.

Como pode-se observar na Figura 1. 9, o espalhamento elástico (Rayleigh) ocorre quando os fótons excitam a molécula a um estado virtual, que não corresponde, em níveis energéticos, a um auto estado da molécula, e ao relaxar retorna ao mesmo valor energético anterior.

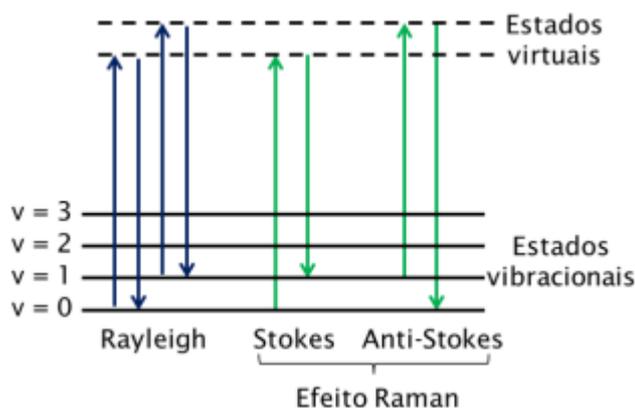


Figura 1. 9: Os tipos de espalhamento que podem ocorrer em um experimento Raman.

No espalhamento do tipo Stokes, o fóton espalhado é menos energético que o fóton incidente, sendo parte da energia transferida à molécula que retorna a um estado vibracional de maior energia, logo os fótons provenientes do espalhamento Stokes possuem menor energia do que o feixe monocromático incidente na amostra.

Ja no espalhamento anti-Stokes as moléculas partem de um estado vibracional excitado, ascendem a um estado virtual e retornam a um estado vibracional de menor energia, com uma frequência oscilatória menor, logo os fótons provenientes do espalhamento Anti-Stokes possuem maior energia do que os fótons incididos na amostra, havendo uma transferência de energia da molécula para o fóton.

As bandas espectrais no Raman são sempre deslocadas por uma frequência constante que por sua vez dependem da fonte de excitação³⁶, geralmente o espectro apresenta deslocamentos que variam de 0 a 3500 cm^{-1} ³².

Dentre os dois tipos de espalhamento, apenas o inelástico (Stokes e anti-Stokes) fornece o efeito Raman observado nas análises, e apenas uma porcentagem muito pequena dos fótons emitidos pela fonte de irradiação sofrem espalhamento inelástico, cerca de $0,0001\%$ ³⁵, portanto o espalhamento Raman é um fenômeno de baixa intensidade e a otimização da instrumentação é essencial para aplicação da técnica.

A eficiência do espalhamento Raman para uma determinada banda espectral observada é dependente da quarta potência da frequência do comprimento de onda utilizado para fazer a análise, de acordo com a expressão (1.9).

$$I_{\text{raman}} \propto (\nu_{\text{laser}} - \nu_{\text{banda}})^4 \quad (1.9)$$

Onde I_{raman} é a intensidade do sinal de uma banda espectral, ν_{laser} é a frequência do laser incidente na amostra e ν_{banda} é a frequência relativa a onda do fóton espalhado.

De acordo com expressão (1.9) pode-se deduzir que a intensidade do sinal de uma banda aumentará com o uso de laser de maior frequência, ou menor comprimento de onda. Alguns instrumentos de espectroscopia Raman possuem dois ou mais conjuntos ópticos para trabalharem com diferentes tipos de lasers. O laser de 785nm e o laser de 1064 nm, que são comprimentos de onda característicos do infravermelho próximo³², são os mais utilizados para amostras farmacêuticas. Quanto menor o comprimento de onda do laser, maior será a intensidade do espectro. Contudo, deve-se levar em consideração a possibilidade de ocorrer fluorescência na amostra devido ao aumento de energia do laser, limitando a escolha do comprimento de onda do laser³².

Um aspecto importante que diferencia a espectroscopia Raman da espectroscopia no infravermelho está na própria natureza dos fenômenos físicos das duas técnicas. Na espectroscopia do infravermelho a parte do campo elétrico da onda eletromagnética interage com o dipolo elétrico da molécula, fazendo com que esse dipolo vibre como um oscilador harmônico. Já na espectroscopia Raman o campo elétrico da onda eletromagnética polariza a molécula, causando espalhamento da luz incidente. Via de regra as bandas de forte intensidade na espectroscopia infravermelha são referentes a vibrações que envolvem dipolos fortes (como ligações majoritariamente polares), enquanto que na espectroscopia Raman as bandas com forte intensidade são referentes a vibrações que envolvem dipolos fracos ou ausentes (como ligações majoritariamente funcionais apolares)³².

Para fins de análise em fármacos a espectroscopia Raman possui algumas vantagens frente à espectroscopia no infravermelho, a saber³⁵:

1. A espectroscopia Raman é não invasiva e o espectro Raman de materiais poliméricos, assim como vidros e blister é de baixa intensidade, permitindo a análise do produto final na embalagem.

2. A espectroscopia Raman pode ser utilizada para estudo de pequenas partículas em amostras não homogêneas. Muitos fármacos são formulados utilizando microcristais de princípio ativo em uma matriz sólida que contém excipientes sólidos como material diluente do princípio ativo.
3. Possibilita análises em meio aquoso, uma vez que a água possui espalhamento Raman pouco intenso.

1.5 Os fármacos e suas características.

Os fármacos possuem características distintas entre si e a formulação de produtos em estado sólido depende dessas características. Um sistema de classificação amplamente aceito e citado em vários estudos é o Sistema de Classificação Biofarmacêutica (BCS, do inglês *Biopharmaceutical Classification System*) elaborado pela FDA³⁷. Nesse sistema os fármacos são classificados em quatro classes que correlacionam a permeabilidade (absorção por parte dos tecidos) e solubilidade do fármaco (capacidade de se solubilizar no organismo). Como pode ser visto no gráfico exposto na Figura 1. 10.

De acordo com o gráfico vê-se que os fármacos classe I possuem a característica de serem altamente solúveis e permeáveis, na classe II os fármacos são pouco solúveis e altamente permeáveis, na classe III os fármacos são altamente solúveis e pouco permeáveis e na classe IV os fármacos pouco solúveis e pouco permeáveis.

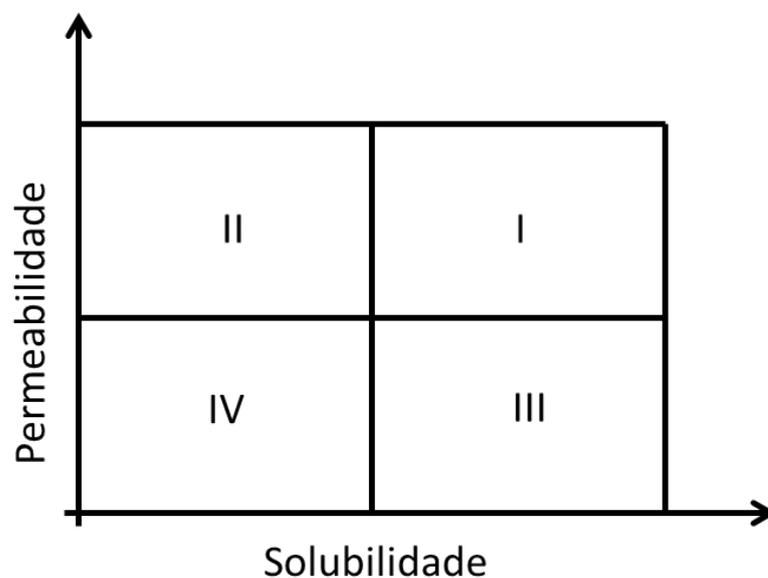


Figura 1. 10: Sistema de classificação BCS.

Neste estudo utilizaram-se três fármacos da classe II: a Carbamazepina, o bisulfato de clopidogrel e a ezetimiba, pois a biodisponibilidade é altamente afetada pela forma polimórfica, considerando a baixa solubilidade destes APIs.

1.5.1 Carbamazepina.

A carbamazepina é um fármaco utilizado como anticonvulsivante utilizado para tratamento de epilepsia, transtorno bipolar e neuralgia do trigêmeo. Sua ação consiste em diminuir a atividade dos neurônios por meio de bloqueamento dos canais de sódio^{38,39}. Sua fórmula molecular é $C_{15}H_{12}N_2O$ e nomenclatura IUPAC é 5H-Dibenzo(b,f)azepina-5-carboxamina. A fórmula estrutural da molécula está representada na Figura 1. 11.



Figura 1. 11: Estrutura molecular planar e tridimensional da Carbamazepina.

Existem registros de até oito polimorfos de Carbamazepina e outros solvatomorfos^{40,41}. Dentre as formas mais usuais estão a forma I (triclinica), a forma II (trigonal) e as forma III e IV, ambas monoclinicas. A forma III é aquela que é utilizada comercialmente nos comprimidos e pode sofrer rápida hidratação pela própria umidade do ambiente, formando um dihidrato que tem taxa de solubilidade menor do que a forma III⁴²

A carbamazepina apresenta histórico de variação de performance, bem como de falha no tratamento clínico. Alguns artigos demonstram que há alta variabilidade na taxa de dissolução do fármaco, mesmo em comprimidos da mesma marca^{43,44}, causado por alteração polimórfica ou solvatomórfica do mesmo.

1.5.2 Ezetimiba.

O fármaco ezetimiba pertence a classe de fármacos utilizados para diminuir a absorção de lipídeos pelo organismo e é prescrito para controle dos níveis de colesterol em pacientes. É comercializado com o nome de Zetia® e Ezetrol® e é produzido pela empresa Merck e Schering-Plough pharmaceuticals. A ezetimiba pode ser administrada sozinha ou ser combinada com a sinvastatina, de acordo com as limitações do paciente.

O mecanismo de ação da ezetimiba consiste em se alojar nas vilosidades do intestino delgado, impedindo a absorção do colesterol⁴⁵. A fórmula molecular da ezetimiba é $C_{24}H_{21}F_2NO_3$, sua fórmula estrutural está descrita na Figura 1. 12 e o nomenclatura IUPAC é 1-(4-fluorofenil)-3(R)[-3-(4-fluorofenil)-3(S)-hidroxipropil]-4(S)-(4-hidroxifenil)-2-azetidionona⁴⁵.

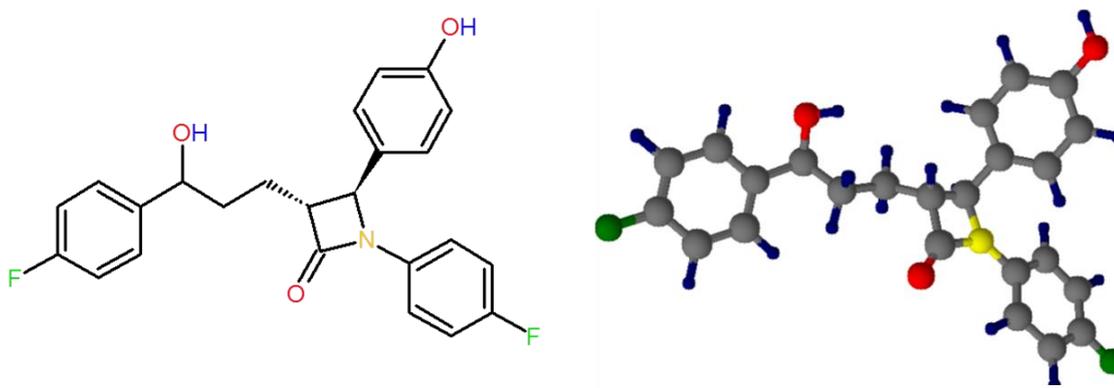


Figura 1. 12: Estrutura molecular planar e tridimensional da ezetimiba.

Não há na literatura muita informação à respeito da ezetimiba, sendo que até o momento da redação dessa tese foram encontrados apenas alguns trabalhos sobre esse fármaco⁴⁶⁻⁴⁸. Um dos motivos de existirem poucos trabalhos na literatura é que a Ezetimiba é um fármaco relativamente novo, tendo seu registro aceito em 2002⁴⁹.

A ezetimiba apresenta uma relativa facilidade de sofrer transformação de sua forma anidra para a forma hidratada, sendo que a última apresenta taxa de solubilidade cerca de 35% menor, em água⁵⁰. Por ser um fármaco de classe II, de acordo com o sistema de classificação BCS, a presença de um hidrato de ezetimiba na formulação prejudicará o efeito terapêutico do fármaco, devido a diminuição de solubilidade.

1.5.3 Bisulfato de Clopidogrel

O bisulfato de Clopidogrel é um fármaco utilizado para evitar a agregação de plaquetas. É indicado para pacientes que possuem propensão para problemas vasculares, sendo eles cardíacos (infarto) ou cerebrais (acidente vascular cerebral) e trombose⁵¹. A fórmula molecular do bisulfato de clopidogrel é $C_{16}H_{16}ClNO_2S \cdot H_2SO_4$, sua nomenclatura IUPAC é metil (+)-(S)-alfa-(2-clorofenil)-6,7-diidrotieno[3,2-c]piridina-5(4H)-acetato sulfato (1:1)⁵¹ e sua fórmula estrutural planar e tridimensional estão apresentadas na Figura 1. 13.

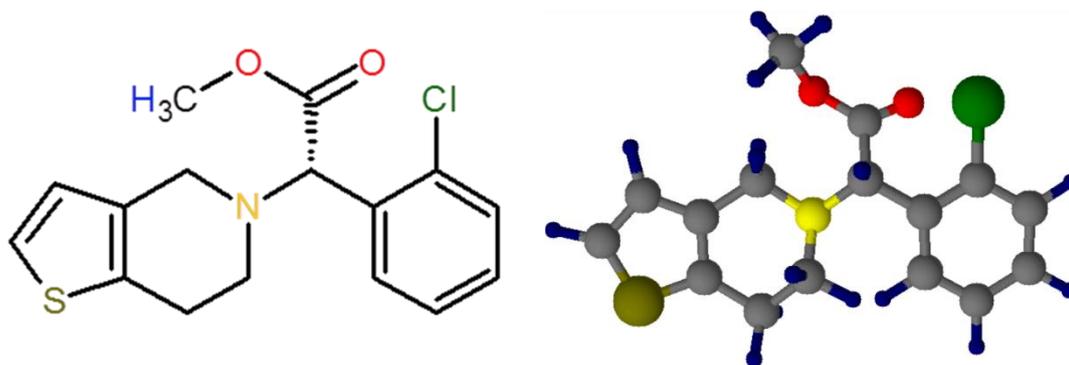


Figura 1. 13: Estrutura molecular planar e tridimensional do bisulfato de clopidogrel.

Existem mais de 6 polimorfos de bisulfato de clopidogrel⁵², contudo apenas os polimorfos I e II são utilizados nas formulações⁵³. Uma opção que tem sido estudada para melhorar a solubilidade dos fármacos da classe II e IV (BCS) é a produção da fase amorfa do princípio ativo. A fase amorfa não possui organização cristalina, logo, o processo de solubilização necessita de uma quantidade menor de energia quando comparado a outras formas cristalinas, já que a falta de retículo cristalino confere a fase amorfa uma estabilidade termodinâmica menor^{51,53}.

1.6 A quantificação de polimorfos e a utilização de ferramentas quimiométricas.

A pesquisa por métodos de quantificação de polimorfos em uma formulação é recente e órgãos reguladores em nível mundial como FDA e em nível nacional como a ANVISA ainda não possuem uma metodologia padronizada para o controle de qualidade desses fármacos. A necessidade se torna ainda mais evidente devido às implicações jurídicas que ocorrem na indústria farmacêutica brasileira no que tange à produção de genéricos, uma vez que a patente de polimorfos está vigente e se torna necessário a produção de genéricos

com polimorfos que sejam diferentes daqueles defendidos por tal patente. Outro problema claro é a qualidade que o produto genérico pode vir a ter uma vez que um dado polimorfo pode possuir características físicas e químicas que impossibilitam sua comercialização por serem tóxicos ou pouco solúveis. Deve-se ainda levar em conta a possibilidade de transformação polimórfica no processo de produção ou estocagem. Dado essas observações torna-se evidente a necessidade de métodos quantitativos e qualitativos de polimorfismo em fármacos.

Para análise de polimorfismo em fármaco pode-se utilizar tanto espectroscopia no infravermelho quanto a espectroscopia Raman, pois ambas apresentam espectros com bandas claras e bem definidas de moléculas orgânicas, as quais constituem os princípios ativos. Essa característica de ambas as técnicas é essencial para análises de fármacos, que tipicamente apresentam uma complexa mistura de excipientes e princípio ativo⁵⁴.

Espectroscopia de Infravermelho e Ramansão técnicas analíticas complementares. Levando-se em consideração os fundamentos físicos de ambas as técnicas e a característica da maioria das formulações em estado sólido (comprimidos), pode-se eleger a melhor técnica dentre as duas para realizar a análise. Para fins quantitativos deve-se levar em consideração que, para a maioria dos comprimidos, a maior parte de sua massa é constituída de excipientes e uma pequena parte é referente ao princípio ativo.

Excipientes possuem inúmeras funções em uma formulação sólida, semi-sólida ou líquida. A ANVISA tem em seu site uma tabela exibindo as funções que os excipientes podem realizar em uma formulação⁵⁵. Geralmente, um comprimido é constituído em sua maioria por um excipiente que tem por função ser o diluente e o veículo, ou seja, é onde o princípio ativo está disperso e por meio deste será conduzido ao local correto onde ocorrerá sua liberação. Diluentes e veículos são moléculas inertes com forte momento de dipolo, como por exemplo, Croscamelose Sódica, Lactose, Celulose microcristalina, entre outros. Como pode-se observar, tratam-se de moléculas que possuem heteroátomos com alta eletronegatividade o que confere a elas forte momento dipolar. Por conta dessa característica dos excipientes e de sua proporção na formulação de um comprimido, deu-se preferência a utilização da espectroscopia Raman que, devido as suas características, retorna um sinal dos excipientes com baixa intensidade, privilegiando o sinal do princípio ativo, que se encontra em baixa proporção.

Ambas as técnicas, Raman e infravermelho, precisam de análise multivariada quando utilizadas para fins quantitativos^{25,27,28,56} devido às características dos espectros obtidos. A maioria das amostras utilizadas são complexas e fornecem um espectro com variação em várias bandas espectrais. A utilização de apenas uma variável (comprimento de onda, Raman shift) para realizar uma calibração univariada pode conduzir à erros de predição. Aqui cabe explicar à respeito dos métodos de calibração de ordem zero, de primeira ordem e de ordens superiores.

Métodos de calibração de ordem zero são aqueles que se valem de um único valor de variável relacionado a uma grandeza química, como por exemplo um valor de pH que indica a concentração de íons H^+ em solução. Esse tipo de calibração é amplamente conhecido e tem seu tratamento estatístico como erro de predição e as figuras de mérito bem estabelecido. Contudo, a presença de interferentes pode mascarar o resultado real, levando a um erro de predição. Em análises de amostras complexas se faz necessário a realização da abertura de amostra, fazendo com que a amostra passe por vários procedimentos químicos afim de eliminar os interferentes. Embora esse tipo de abordagem seja necessário em muitos casos é dispendioso em tempo e custo.

Os métodos de calibração de primeira ordem geram um conjunto de dados com mais variáveis relacionados a uma grandeza química, dando origem a um vetor. Um exemplo desse tipo de calibração está na utilização de técnicas espectroscópicas como Raman e Infravermelho para medição do teor de proteínas em trigo. Esse tipo de amostra tem vários interferentes, mas não se faz necessário a eliminação desses interferentes para a medição do referido teor, pois métodos de calibração como o PLS, PCR entre outros, permitem a medida de tal teor na presença de interferentes, uma vez que eles estarão presentes no conjunto de calibração.

Já os métodos de calibração de segunda ordem são aqueles que geram um conjunto de dados em forma de uma matriz. Geralmente as técnicas hífenadas como HPLC-DAD (cromatografia com detector de arranjo de diodos) ou HPLC-MS (cromatografia com detector de massas) geram um dois vetores de conjunto de dados que formam uma matriz. A vantagem de segunda ordem se encontra no fato de que é possível fazer a calibração de um determinada grandeza na presença, ou não, de seus interferentes. Contudo, se faz necessário a utilização de métodos quimiométricos de ordem superior como o PARAFAC, que limitam a rotação dos dados entre os modos. O surgimento de ferramentas de calibração de segunda

ordem e ordens superiores permitiram a análise de amostras biológicas ou de amostras com muita complexidade empregando um número muito reduzido de amostras^{57,58}

Existem muitas ferramentas quimiométricas para se realizar uma calibração multivariada, porém a mais utilizada é o PLS (do inglês *Partial Least Squares*) ou regressão por mínimos quadrados parciais²⁸, devido à simplicidade do algoritmo e bom poder de previsão⁵⁹. Do PLS surgiram outras evoluções como o iPLS (do inglês *interval partial least squares*) onde apenas alguns intervalos das variáveis espectrais são utilizados⁶⁰, eliminando informações redundantes, melhorando os erros de previsão do modelo a ser construído.

Outra necessidade da indústria farmacêutica é o desenvolvimento de métodos analíticos para monitorar sua produção *in-line*, ou seja, com a utilização de uma sonda que monitore a linha de produção e forneça resultados rápidos para que se possa controlar a qualidade dos produtos e interferir na produção, em tempo hábil, caso ocorra algum problema. Essa necessidade pode ser plenamente atendida pela espectroscopia Raman associada aos métodos multivariados como PLS. Uma outra ferramenta quimiométrica de excelente aplicabilidade é a resolução multivariada de curvas (MCR), pois com o uso desta ferramenta pode-se estimar a velocidade com a qual o princípio ativo sofre uma transição polimórfica⁶¹.

CAPÍTULO 2–MÉTODOS QUIMIOMÉTRICOS

2- Métodos quimiométricos

2. Métodos quimiométricos

O termo quimiometria foi inicialmente criado por Svante Wold em 1971⁶². Kowalski e Wold foram pioneiros no avanço da quimiometria, muito embora já houvesse uma disciplina lidando com quimiometria nos anos 60, antes do termo ter sido definido. Kowalski definiu a quimiometria como sendo “um veículo que pode auxiliar os químicos a se moverem na direção do maior conhecimento”. Outra definição de quimiometria dada por Wold é: “a arte de extrair informação química relevante de dados produzidos em experimentos químicos⁶³”.

Os métodos quimiométricos surgiram da possibilidade de se tratar um grande volume de dados devido a “explosão de dados” que ocorreu devido ao surgimento de métodos instrumentais computadorizados para análise química. Desse grande volume de dados, surgiu a necessidade da utilização de métodos estatísticos e matemáticos para analisá-los e extrair informações úteis. À princípio, alguns métodos foram adaptados de outras áreas de conhecimento como a economia⁶⁴.

Atualmente a quimiometria pode ser dividida em :

- Processamento de sinais analíticos.
- Planejamento e otimização de experimentos.
- Reconhecimento de padrões e classificação dos dados.
- Construção de modelos de regressão.
- Desenvolvimento e aplicação de métodos de inteligência artificial.

Neste estudo utilizou-se apenas processamento de sinais analíticos, planejamento e otimização de experimentos e a construção de modelos de regressão.

2.1. Planejamento experimental.

O planejamento de experimentos tem por objetivo definir um arranjo experimental que proporcione uma otimização da informação obtida à partir de um número mínimo de experimentos⁶⁵. Para isto deve-se combinar todos os fatores (ou variáveis) envolvidos de maneira simultânea e então utilizar os dados obtidos para montar um modelo. As interações entre as variáveis do sistema só podem ser identificadas por meio de análise multivariada, enquanto no método univariado cada fator é otimizado de maneira

2- Métodos quimiométricos

independente, mantendo-se as outras variáveis em níveis constantes, desconsiderando a interação entre as mesmas. Dessa forma, um valor ótimo encontrado pelo método univariado pode não ser verdadeiro, uma vez que desconsidera a interação entre variáveis, que ocorrerão no sistema real.

Um dos grandes problemas do planejamento de experimentos está em encontrar um arranjo experimental adequado para um conjunto de calibração. Em muitos casos não é possível controlar as variáveis de um conjunto de calibração de maneira satisfatória, porém o preparo de misturas em laboratório é um caso mais simples de se resolver. Muitos quimiometristas recomendam que o conjunto de calibração possua muitas amostras, principalmente se há muitas variáveis influenciando a resposta obtida. O fundamento de se montar um conjunto de calibração com muitas amostras é que o modelo pode se tornar mais robusto. Contudo, montar um modelo com um grande conjunto de calibração pode consumir muito tempo e recurso financeiro, logo deve-se levar em consideração quão robusto o modelo precisa ser e pode-se obter modelos de calibração bem robustos utilizando um planejamento adequado²⁸.

Nesta tese de doutorado estudaram-se misturas de 2 e 3 polimorfos para os fármacos anteriormente citados. Para uma mistura ternária utilizou-se o arranjo experimental de mistura ternária descrito na Figura 2. 1. Neste tipo de arranjo experimental cada fator ou variável (polimorfo) terá 5 níveis de concentração.

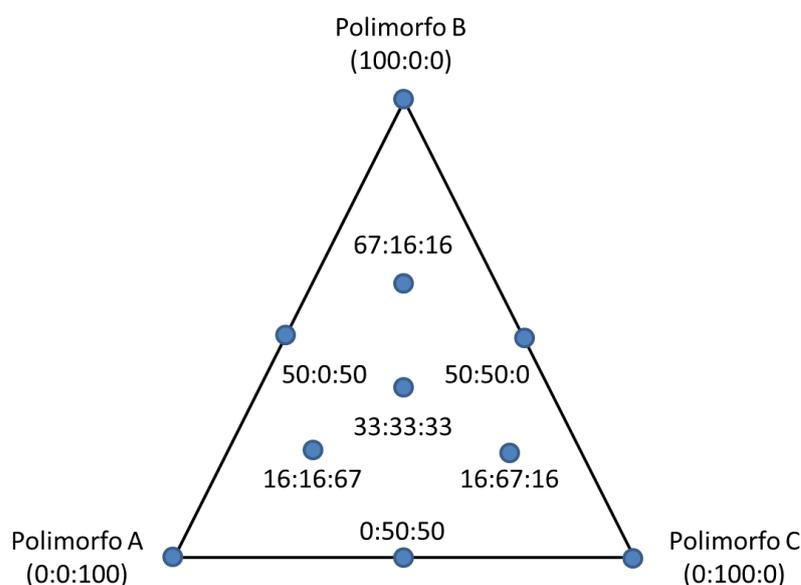


Figura 2. 1: Diagrama de distribuição das amostras em uma mistura ternária.

2- Métodos quimiométricos

Outra maneira de representar o planejamento de misturas ternárias esta na Tabela 2-1, onde é possível observar a distribuição de cada mistura. Para cada polimorfo há 5 misturas diferentes de concentração relativos a sua proporção em massa (0, 1/6, 1/2, 2/3, 1) e suas possíveis combinações (mistura) com outros polimorfos.

Tabela 2-1: Arranjo experimental do tipo ternário, a distribuição dos níveis no conjunto de calibração

	Variáveis ou fatores		
	Polimorfo A	Polimorfo B	Polimorfo C
Amostra 1	1	0	0
Amostra 2	0	1	0
Amostra 3	0	0	1
Amostra 4	1/2	1/2	0
Amostra 5	1/2	0	1/2
Amostra 6	0	1/2	1/2
Amostra 7	2/3	1/6	1/6
Amostra 8	1/6	2/3	1/6
Amostra 9	1/6	1/6	2/3
Amostra 10	1/3	1/3	1/3

Os espectros retirados das amostras possuem respostas lineares quando ocorrem incrementos na concentração, respeitando portanto a lei de Lambert-Beer. Logo, um bom modelo de calibração deve ser feito utilizando combinações de concentração que explorem todas as possibilidades que serão encontradas em amostras reais. Essas combinações causarão alterações nos padrões espectrais das amostras (aumento ou diminuição em alguns picos) e sendo assim, quando ao modelo for adicionado novos dados, os novos padrões espectrais serão comparados aos padrões contidos no modelo e produzirão um resultado. Contudo, se houver alguma combinação não explorada no modelo o mesmo falhará ao prever a concentração de uma amostra que contenha essa combinação específica. Daí a necessidade de se utilizar as combinações de níveis que explorem todas as regiões de uma curva de calibração²⁸.

Ja o planejamento experimental utilizado neste estudo para combinação de 2 polimorfos é mais simples, pois parte do princípio da complementaridade, onde as proporções

2- Métodos quimiométricos

em massa dos componentes da mistura de polimorfos serão sempre iguais a massa total do princípio ativo que deve estar no comprimido. Em comprimidos comercializados pode-se assumir que a transição entre polimorfos pode ocorrer apenas entre duas formas, ou ainda de uma forma anidra se transformando em seu hidrato mais estável. Sendo assim, suas concentrações são complementares e a soma das duas concentrações será igual à concentração total do princípio ativo no comprimido.

2.2. Regressão por mínimos quadrados parciais (PLS).

Dentre as áreas de estudo da quimiometria a calibração multivariada encontrou uma vasta área para ser implementada na química analítica²⁸. Métodos de calibração univariados são simples de serem compreendidos, porém a aplicação de calibração univariada em amostras reais, como em amostras de alimentos e produtos farmacêuticos, se tornam tarefas complexas devido ao número de processos analíticos que deve ser realizado para retirar os interferentes da matriz e poder analisar somente o composto químico de interesse. Esse tipo de abordagem pode ter custo elevado e consumir longo tempo de análise.

Outra ferramenta da quimiometria explorada neste estudo foi a de construção de modelos de regressão multivariados. O PLS é o modelo de regressão multivariado mais utilizado em trabalhos de química²⁸, muito embora tenha sido utilizado de maneira equivocada em algumas aplicações. Contudo, sua capacidade de propiciar modelos de regressão e a simplicidade do algoritmo tornaram o PLS a ferramenta quimiométrica que alavancou o crescimento da quimiometria⁶². O PLS está intimamente associado a dados espectroscópicos (NIR, MIR, Raman)⁶⁶, já que o PLS é uma excelente solução para criar modelos de calibração a partir de técnicas que possuem baixa seletividade, porém mais baratas e rápidas quando comparadas à cromatografia, além de necessitar de preparo mínimo de amostra.

Geralmente o PLS é representado na forma de duas equações, como descrito em (2.1) e (2.2).

$$\mathbf{X} = \mathbf{T} \cdot \mathbf{P}^T + \mathbf{E} \quad (2.1)$$

$$\mathbf{Y} = \mathbf{U} \cdot \mathbf{Q}^T + \mathbf{f} \quad (2.2)$$

2- Métodos quimiométricos

O PLS decompõe a matriz de dados \mathbf{X} e a matriz de respostas \mathbf{Y} em duas matrizes menores, \mathbf{P}^T e \mathbf{Q}^T respectivamente. Associados a \mathbf{P}^T e \mathbf{Q}^T há duas matrizes \mathbf{T} e \mathbf{U} com os escores.

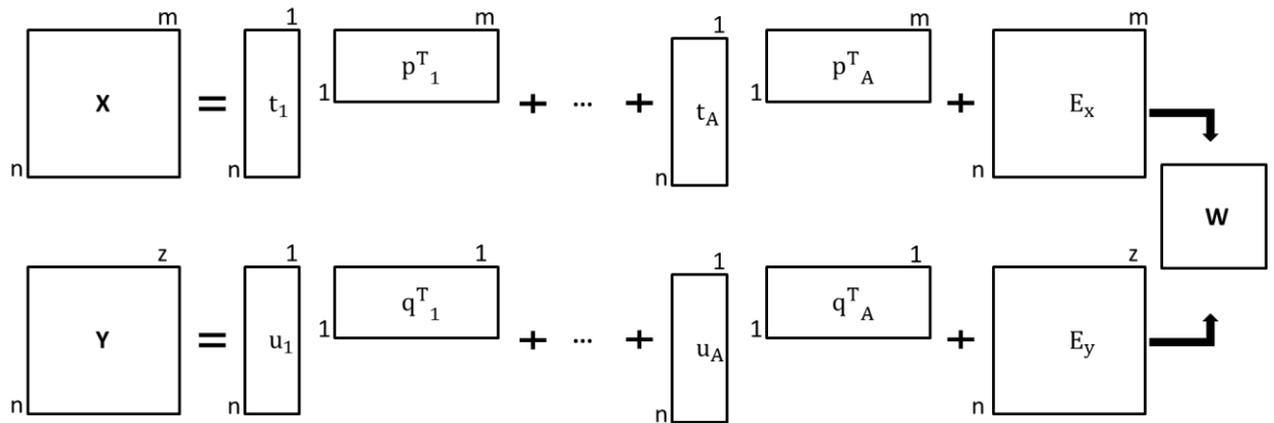


Figura 2. 2: Representação da decomposição das matrizes decorrentes do PLS.

Quando os escores de \mathbf{T} e \mathbf{U} estão otimizados, calculam-se os loadings e por fim os coeficientes de regressão que entrarão na combinação linear para gerar o modelo PLS. A etapa para otimização dos escores envolve 6 passos que serão descritos a seguir:

1. Inicialmente escolhe-se um score \mathbf{u}_1 de maneira aleatória, que é uma combinação linear dos vetores da matriz \mathbf{Y} .
2. Utilizando-se o vetor \mathbf{u}_1 , calcula-se o vetor \mathbf{w}_1 para a primeira componente, seguido de normalização:

$$\mathbf{w}_1 = \mathbf{X}^T \mathbf{u}_1 (\mathbf{u}_1^T \mathbf{u}_1)^{-1} \quad (2.3)$$

$$\mathbf{w}_1 = \frac{\mathbf{w}_1}{\|\mathbf{w}_1\|} \quad (2.4)$$

3. Com o vetor de pesos \mathbf{w}_1 calcula-se o vetor de escores \mathbf{t}_1 da primeira componente de \mathbf{X} .

$$\mathbf{t}_1 = \mathbf{X} \mathbf{w}_1 \quad (2.5)$$

4. Com o vetor de escores \mathbf{t}_1 calcula-se os loadings \mathbf{q}_1 para matriz \mathbf{Y} , seguido de normalização.

2- Métodos quimiométricos

$$q_1 = \mathbf{Y}^T \mathbf{t}_1 \left((\mathbf{t}_1^T \mathbf{t}_1) \right)^{-1} \quad (2.6)$$

$$q_1 = \frac{q_1}{\|q_1\|} \quad (2.7)$$

5. Com o vetor \mathbf{q}_1 pode-se calcular um novo vetor \mathbf{u}_1^* .

$$\mathbf{u}_1^* = \mathbf{Y}^T q_1 \left((q_1^T q_1) \right)^{-1} \quad (2.8)$$

6. Após o cálculo dos loadings e escores reinicia-se o processo à partir da etapa 2 e então obtêm-se novos valores \mathbf{w}_1^* e \mathbf{t}_1^* e então considera-se a seguinte proposição (teste de convergência).

Se $|\mathbf{t}_1^* - \mathbf{t}_1| > \text{que } 10^{-6}$ o processo é reiniciado.

Se $|\mathbf{t}_1^* - \mathbf{t}_1| < \text{que } 10^{-6}$ o processo cessa e assume-se o valor de \mathbf{t}^* .

O valor crítico é assumido como 10^{-6} mas pode-se assumir outro valor, dependendo da precisão necessária ao modelo

7. Com os valores de \mathbf{t}_1^* é possível calcular os loadings \mathbf{p}_1 de \mathbf{X}

$$\mathbf{p}_1 = \mathbf{X}^T \mathbf{t}_1^* \left(\mathbf{t}_1^{*T} \mathbf{t}_1^* \right)^{-1} \quad (2.9)$$

8. Enfim pode-se calcular o primeiro coeficiente de regressão da seguinte maneira.

$$b_1 = \mathbf{u}^T \mathbf{t}_1^* \left(\mathbf{t}_1^{*T} \mathbf{t}_1^* \right)^{-1} \quad (2.10)$$

9. Nesta etapa subtrai-se a primeira componente do modelo e calcula-se novas componentes para a informação restante do conjunto.

$$\mathbf{X}^* = \mathbf{X} - \mathbf{t}_1^* \mathbf{p}_1^T \quad (2.11)$$

$$\mathbf{Y}^* = \mathbf{Y} - b_1 \mathbf{t}_1^* q_1^T \quad (2.12)$$

À partir da etapa 9 o cálculo recomeça com o que resta de informação no conjunto de dados⁶⁷. O algoritmo explicado é iterativo conhecido como NIPALS (do inglês

2- Métodos quimiométricos

Nonlinear iterative partial least squares). Existe também outro algoritmo conhecido SIMPLS, que é uma modificação do NIPALS, porém realiza cálculos de maneira mais rápida⁶⁷ e é utilizado na maioria dos pacotes estatísticos que efetuam PLS.

2.2.1. PLS em intervalos de variáveis (iPLS).

Métodos de regressão que utilizam todas as variáveis do espectro, como o PLS e o PCR (do inglês *principal components regression*) ficaram bem conhecidos e possuem um vasto número de exemplos na literatura comprovando sua eficiência. A aplicação de PLS envolvendo todas as variáveis de um espectro é prática comum entre quimiometristas, contudo pode haver informações redundantes em algumas variáveis de um conjunto de espectros, ao passo que algumas outras variáveis podem conter informações muito mais relevantes. Em espectroscopia existem regiões espectrais que trazem informações específicas de grupos químicos como cromóforos, fluoróforos entre outros⁶⁰. Logo, utilizar um modelo regressão do tipo PLS com apenas variáveis que contenham informações relevantes pode melhorar os parâmetros estatísticos do modelo, além disso, há que se levar em consideração o fato de que a decomposição espectral em variáveis latentes pode não criar um modelo realístico, e a análise de apenas algumas variáveis de interesse pode solucionar esse problema⁶⁰.

As chances de um conjunto aleatório de intervalos ser escolhido e fornecer o melhor modelo de iPLS é mínima. Portanto, existem alguns métodos para se encontrar as variáveis mais significantes para um modelo. O mais simples deles é feito por meio de duas etapas em sequência: 1) mudança de intervalo escolhido, 2) mudança no tamanho do intervalo escolhido, onde se adiciona uma variável a mais no intervalo. Essa adição pode ocorrer de maneira simétrica, sendo então adicionadas duas variáveis ao intervalo, uma de cada lado, ou de maneira assimétrica, onde será adicionada uma variável à esquerda ou à direita. A cada adição de variável constrói-se um modelo e verifica-se o valor de RMSECV (do inglês *root mean square error of cross validation*) referente ao PLS realizado no dito intervalo. Os intervalos que fornecerem o menor valor de RMSECV serão adotados para a construção do modelo de calibração.

Outro modo de se selecionar os melhores intervalos para o modelo de regressão iPLS é por meio do cálculo das variáveis principais PV (do inglês *principal variables*), onde seleciona-se a variável “x” (variável espectral) com maior covariância da matriz de dados em

2- Métodos quimiométricos

relação ao vetor “y” (medida física/química). Essa será a primeira variável principal e em seguida será buscada a segunda variável com maior covariância na matriz de dados original que foi reduzida da primeira variável. A matriz de dados será reduzida das subseqüentes variáveis até que não haja mais uma covariância relevante entre as variáveis restantes.

Um terceiro método chamado de FSS (do inglês *forward stepwise selection of variables*), ou seleção de variáveis por passos adiante, é tido como o método mais simples e objetivo dentre todos e baseia-se na escolha subseqüente de variáveis que são selecionadas passo a passo por sua capacidade de melhorar um modelo de regressão linear múltipla (MLR, do inglês *multiple linear regression*). Inicialmente, todas as variáveis espectrais são testadas individualmente em uma regressão linear univariada, tendo como variável dependente seus valores de concentração. Todos os modelos resultantes são testados como conjunto de validação e aquela variável que fornecer menor RMSEP (do inglês *root mean square error of prediction*) ou erro de predição é escolhida. Em seguida a variável escolhida será testada com todas as outras variáveis restantes, uma por uma, dando origem a modelos de regressão linear múltipla com duas variáveis. A análise dos modelos é feita com base no menor valor de RMSEP, selecionando então a segunda variável a entrar no modelo. Esse processo será repetido até que a introdução de uma nova variável faça o valor de RMSEP aumentar⁶⁰. Esse é o método mais utilizado nos pacotes estatísticos que realizam modelos de iPLS.

2.3. MCR-ALS, resolução multivariada de curvas por mínimos quadrados alternados.

A ferramenta quimiométrica MCR (do inglês *multivariate curve resolution*) é um método de processamento de sinais analíticos de natureza complexa, como por exemplo sinais analíticos de uma amostra que contém uma mistura de compostos químicos. Essa ferramenta quimiométrica recupera valores de concentração relativa e os espectros puros dos componentes de uma mistura, tal recuperação é realizada sobre uma ou mais matrizes de dados (espectros, por exemplo).

O MCR realiza uma decomposição bilinear dos dados contidos nas matrizes $D_{(l \times c)}$ utilizando o algoritmo ALS. A decomposição bilinear respeita a equação (2.13).

$$D_{(l \times c)} = C_{(l \times k)}S^T \quad (2.13)$$

2- Métodos quimiométricos

A variável “l” representa as linhas da matriz D, geralmente “l” é referente as amostras do planejamento. A variável “c” é referente as colunas da matriz D, geralmente representa as variáveis contidas em um espectro e “k” é referente ao número de componentes na amostra.

Considerando a equação (2.13), para a mistura de dois compostos, $D_{(l \times c)}$ será desmembrada em duas outras matrizes D_A e D_B , logo:

$$D = D_A + D_B \quad (2.14)$$

$$D = C_A S_A^T + C_B S_B^T \quad (2.15)$$

As equações (2.14) e (2.15) demonstram que as matrizes serão combinações lineares da matriz D. Dessa forma vê-se que o MCR é capaz de recuperar os sinais analíticos dos componentes puros e estabelecer relações de concentração com esses sinais.

Para que a ferramenta MCR possa realizar as estimativas dos espectros puros e de concentração deve-se inicialmente observar se o sinal analítico obedece a lei de Lambert-Beer e em seguida se o posto da matriz é igual ao número de componentes puros da amostra.

O posto de uma matriz corresponde ao número de linhas ou colunas de uma matriz que são linearmente independentes entre si, ou seja, os vetores que não apresentam combinações lineares. Se há, em uma matriz, apenas dois vetores que são independentes entre si, então o posto da matriz é igual a 2. O posto de uma matriz pode ser calculado pela decomposição da matriz em seus componentes principais, que pode ser realizado pelo algoritmo SVD (do inglês *single value decomposition*). Em uma análise por componentes principais ocorre, por meio do cálculo das componentes principais, uma reorganização dos eixos que contêm as variáveis originais. As variáveis se encontrarão em um novo espaço dimensional onde os eixos são ortogonais entre si e cada eixo corresponde a uma componente principal. Uma vez que as componentes principais são ortogonais entre si, é possível determinar o posto de uma matriz de acordo com o número de componentes principais necessários para descrevê-la⁶⁸.

O MCR estabelecerá relações entre os espectros puros e as variações de concentração dos componentes das misturas. Se houver apenas dois componentes numa mistura, o sinal será uma combinação dos espectros das duas substâncias. Assim, é necessário

2- Métodos quimiométricos

que o modelo tenha informação dos possíveis espectros puros ou das concentrações das substâncias presentes na amostra. Caso a amostra seja completamente desconhecida, o próprio MCR tentará encontrar os espectros puros por meio de dois métodos, a análise de fatores evolucionários (EFA do inglês *Evolving factor analysis*), ou da aproximação da variável pura (PURE). O PURE seleciona as colunas que contenham as variáveis mais puras de acordo com o número de componentes principais que possa haver na mistura. Já o EFA é mais utilizado em análises onde se sabe que há uma variação sequencial dos espectros. Um bom exemplo deste comportamento está no monitoramento de reações.

Uma vez encontrada as variáveis puras (espectros puros) o MCR começa a calcular as concentrações referentes aos espectros através do algoritmo ALS (do inglês *alternating least squares*). À partir desse ponto o método se torna iterativo e seguirá os seguintes passos:

1. Tendo os valores \mathbf{D} e \mathbf{S}^T , calcula-se o valor de \mathbf{C}^* .

$$\mathbf{C}^* = \mathbf{D} \mathbf{S} (\mathbf{S}^T \mathbf{S})^{-1} \quad (2.16)$$

2. Com o valor de \mathbf{D} e \mathbf{C}^* , calcula-se o valor de \mathbf{S}^{T*} .

$$\mathbf{S}^{T*} = (\mathbf{C}^{T*} \mathbf{C}^*)^{-1} \mathbf{C}^{T*} \mathbf{D} \quad (2.17)$$

3. Com os valores \mathbf{C}^* e \mathbf{S}^{T*} , calcula-se \mathbf{D}^* (para avaliar parâmetros de falta de ajuste e porcentagem de variância explicada).

$$\mathbf{D}^* = \mathbf{C}^* \mathbf{S}^{T*} + \mathbf{E} \quad (2.18)$$

Como no outro método iterativo calculado anteriormente é necessário observar se as estimativas encontradas satisfazem o modelo, ou seja, se os valores calculados estão próximos dos valores reais. Sendo assim, realiza-se o cálculo da falta de ajuste:

$$F_{aj} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^m (X_{i,j} - \widehat{X}_{i,j})^2}{\sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^m X_{i,j}^2}} \quad (2.19)$$

2- Métodos quimiométricos

Onde $X_{i,j}$ é o valor X da linha “ i ” e coluna “ j ”, referente a matriz \mathbf{D}^* .

Como anteriormente descrito os valores são considerados convergentes após um determinado número de iterações, ou quando a falta de ajuste for menor que um determinado valor, por exemplo 1×10^{-6} .

Como o modelo MCR-ALS pode encontrar uma infinidade de soluções que podem satisfazer as respostas para os valores da matriz D , é necessário impor algumas restrições às respostas encontradas para que as mesmas tenham significado físico. As restrições mais utilizadas são: não-negatividade para espectros e concentrações, e restrições de igualdade que alimentam o modelo com informações previamente conhecidas, como perfil espectral de uma substância pura, o que evita ambiguidade nos cálculos dos perfis recuperados^{61,68}.

2.4. Rotinas utilizadas.

As análises por MCR-ALS foram realizadas utilizando a rotina ALS do toolbox MCR_ALS disponibilizado pela Universidade de Barcelona pelo Prof. Romà Tauler. As análises por iPLS foram realizadas utilizando o toolbox PLS_toolbox 6.2 da Eigenvector, disponível para MATLAB.

**CAPÍTULO 3–QUANTIFICAÇÃO
SIMULTÂNEA DE TRÊS POLIMÓRFOS DE
CARBAMAZEPINA UTILIZANDO
ESPECTROSCOPIA RAMAN E ANÁLISE
MULTIVARIADA**

3. Quantificação simultânea de três polimorfos de carbamazepina utilizando espectroscopia Raman e análise multivariada.*

* Capítulo publicado: Farias, Marco Antônio dos Santos; Carneiro, Renato Lajarim. Simultaneous Quantification of Three Polymorphic Forms of Carbamazepine Using Raman Spectroscopy and Multivariate Calibration. *Analytical Letters*, v. 47, p. 1043-1051, 2014.

3.1. Introdução e objetivos.

Muitos produtos farmacêuticos podem apresentar o fenômeno de polimorfismo. Dentre as propriedades físicas e químicas influenciadas pelo fenômeno de polimorfismo a taxa de solubilidade é a que tem chamado mais atenção da indústria farmacêutica para o desenvolvimento de novas drogas⁷. A mudança na taxa de dissolução ocorre devido à diferença de energia necessária para dissolver diferentes cristais (diferentes energias relacionadas ao retículo cristalino).

Carbamazepina é uma droga utilizada para tratamento de epilepsia, neuralgia do trigêmeo⁶⁹ e transtorno bipolar³⁸. Seu consumo global é estimado em cerca de 1000 toneladas por ano⁷⁰. Contudo a Carbamazepina apresenta um histórico de performance irregular em sua aplicação.

Vários trabalhos mostraram que os comprimidos de Carbamazepina comercializados apresentam grande variabilidade na taxa de dissolução, mesmo entre aqueles de mesma marca⁴³. Essa variabilidade pode ser explicada com base nos diferentes processos de produção entre as fábricas, levando a formação de diferentes formas cristalinas⁴⁴. O conhecimento acerca de transições polimórficas em produtos comercializados é de grande importância por conta das transformações que podem ocorrer durante o processo de produção, embalagem e estocagem⁷¹. Existem várias formas polimórficas possíveis para Carbamazepina. Getsoian *et.al.* sintetizaram cinco formas polimórficas utilizando cumeno como solvente, preparando soluções supersaturadas e controlando a precipitação dos cristais por meio da temperatura⁷². Dentre as possíveis formas polimórficas de Carbamazepina, a hidratada é a que se forma com mais facilidade e a que causa mais problema na indústria farmacêutica. Geralmente as espécies hidratadas são menos solúveis que as espécies anidras⁴¹.

Considerando que as transformações polimórficas decorrentes do processo de fabricação são difíceis de prevêr e controlar, o desenvolvimento de métodos capazes de detectar e controlar essas transformações são de grande importância para a indústria

farmacêutica⁷³. A necessidade da indústria farmacêutica em controlar o processo de produção, especialmente as transições polimórficas, leva a implementação de técnicas analíticas que forneçam resultados rapidamente. Dentre as técnicas utilizadas para realizar análises de polimorfismo a espectroscopia Raman se encontra entre as mais importantes e estudadas. Isso se deve a sua aplicação em monitoramento *in-line* sem a necessidade de manipular a amostra, o que torna os resultados mais confiáveis, uma vez que há possibilidade de ocorrer transição polimórfica devido a manipulação^{74,75}.

Polimorfos diferentes apresentam interações intermoleculares diferentes, logo a distribuição da nuvem eletrônica em dois polimorfos distintos apresentará padrões de espalhamento únicos⁷⁵. Porém, existem alguns problemas na utilização da espectroscopia Raman para fins quantitativos. Um dos problemas é referente a capacidade de análise em regiões muito pequenas, sendo assim, pode haver problemas de micro heterogeneidade⁷⁶, outro problema envolve a variabilidade do sinal Raman em amostras com diferentes tamanhos de partícula⁷⁷.

As formas polimórficas I e III se transformam na forma diidratada quando expostas à umidade e essas transformações tem sido estudadas por espectroscopia Raman⁷⁸⁻⁸⁰. Neste estudo utilizou-se espectroscopia Raman associada a análise multivariada (iPLS) para quantificar três polimorfos de Carbamazepina usando um método de calibração rápido baseado em um planejamento de misturas ternárias.

3.2. Materiais e métodos.

Carbamazepina (III) (CBZ III) grau USP foi gentilmente cedido por uma companhia farmacêutica local. A carbamazepina diidratada (CBZ DH) foi preparada adicionando água ultrapura à forma III, até que a amostra estivesse completamente imersa. Após três dias a amostra estava seca e a carbamazepina diidratada foi obtida. O polimorfo I de carbamazepina (CBZ I) foi preparado colocando-se uma amostra de polimorfo III na estufa a 170 °C por 2 horas. Os polimorfos de carbamazepina foram caracterizados por difração de raio-x, calorimetria de varredura diferencial e espectroscopia Raman. Para análise de raio-x foi utilizado um difratômetro Rigaku Dmax 2500PC, com fonte de Cobre (comprimento de onda de 0,154 nm), voltagem de 40kV e corrente de emissão de 40 mA. As amostras foram analisadas entre 5° e 45° (2θ) a uma velocidade de 0,2° por minuto.

Para calorimetria de varredura diferencial, foi utilizado um aparelho Shimadzu DSC-60, com uma curva de aquecimento de $10^{\circ}\text{C min}^{-1}$ em atmosfera de Hélio e a faixa de temperatura analisada foi de 30°C a 220°C .

Para as análises por espectroscopia Raman foi utilizado um espectrometro B&W Tek *i*-Raman, modelo BWS 415-785H, com laser de comprimento de onda de 785nm e resolução espectral de $3,5\text{ cm}^{-1}$. Para a preparação do modelo de regressão multivariada utilizou-se a faixa espectral que vai de 91 cm^{-1} até 1708 cm^{-1} , com tempo de aquisição do espectro de 20 segundos. A potência do laser foi ajustada para se obter a melhor relação sinal-ruído para cada amostra e variou entre 32,5 mW até 97,5 mW. A variação na intensidade do sinal Raman foi corrigido por meio de normalização dos dados. Foi utilizada uma lente de 20x no microscópio acoplado ao espectrometro Raman. Em cada amostra foram coletados 10 espectros em diferentes posições com o objetivo de minimizar o efeito da micro heterogeneidade.

O procedimento de calibração foi implementado utilizando-se um planejamento demisturas ternárias dos três polimorfos. As quantidades de polimorfo utilizada em cada amostra encontram-se descritas na Tabela 3- 1. Esse tipo planejamento permite que uma curva de calibração multivariada com os três polimorfos possa ser feita. O baixo número de amostras para a calibração é justificado pelo fato de não haver qualquer interferente a ser modelado. As amostras foram pesadas e em seguida homogeneizadas utilizando um vortex e então foram prensadas utilizando um pastilhador de 13 mm, para que não ocorresse nenhuma transição polimórfica. Nessa fase optou-se por fazer a prensagem sem o uso do mecanismo hidráulico, a prensa foi feita de maneira manual. Para validar o modelo de calibração foram preparadas mais cinco amostras, que possuíam concentrações de polimorfos diferentes daqueles pontos utilizados na curva de calibração.

Tabela 3- 1: Massa em miligramas dos polimorfos nas amostras de calibração e validação. Em parênteses a porcentagem em massa de cada polimorfo na amostra

	Amostras	Polimorfos		
		Carbamazepina forma I	Carbamazepina forma III	Carbamazepina dihidratada
Conjunto de calibração	1	100	0	0
	2	0	100	0
	3	0	0	100
	4	51 (48,6%)	54 (51,4%)	0
	5	52 (49,5%)	0	53(50,5%)
	6	0	51(49%)	53 (51%)
	7	66 (65,3%)	18(17,8%)	17 (16,9%)
	8	18 (17,35%)	68 (65,3%)	18 (17,35%)
	9	18 (17,6%)	17 (16,7 %)	67 (65,7%)
	10	33 (33%)	34 (34%)	33 (33%)
Conjunto de validação	1	10 (9,9%)	11(10,9%)	80 (79,2%)
	2	10(9,9%)	80(79,2%)	11(10,9%)
	3	80 (78,5%)	11 (10,75%)	11 (10,75%)
	4	30 (29,4%)	31 (30,4%)	41 (40,2%)
	5	20 (19,8%)	20 (19,8%)	61 (60,4%)

3.3. Resultados e discussão.

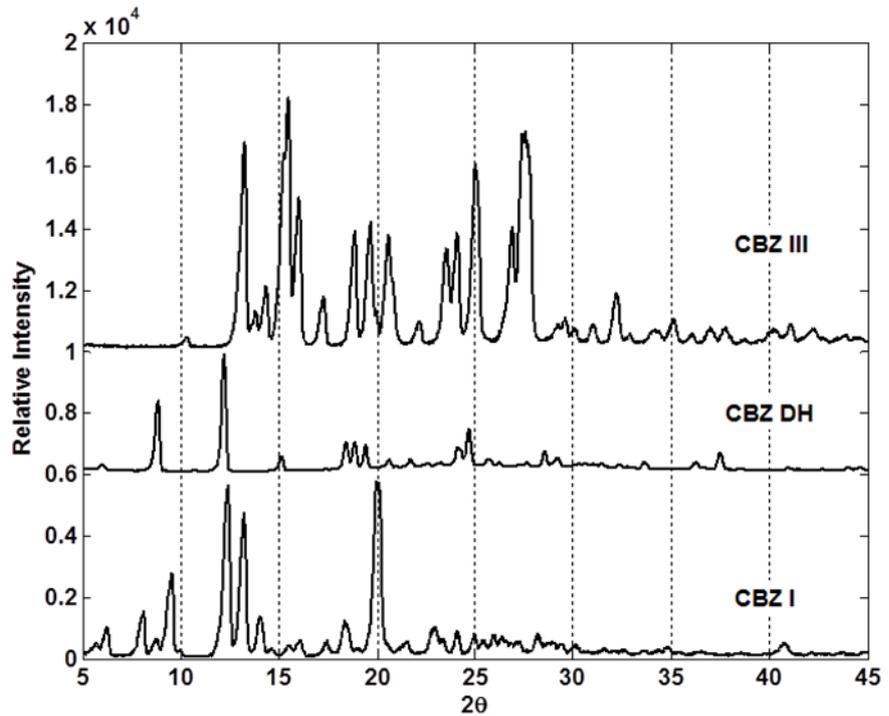
A Figura 3. 1a apresentaos resultados obtidos para as análises de difração de raio-x (DRX) dos três polimorfos de carbamazepina. Os resultados obtidos estão de acordo com os resultados presentes na literatura⁴¹ e os picos presentes no difratograma apresentamos mesmos padrões, indicando que os polimorfos foram sintetizados corretamente.

DRX é a técnica mais utilizada para determinação de polimorfos³³, contudo essa técnica apresenta alguns problemas quando utilizada para quantificar polimorfismo. Se pequenas partículas estiverem presentes na amostra os picos do difratograma se alargarão e a

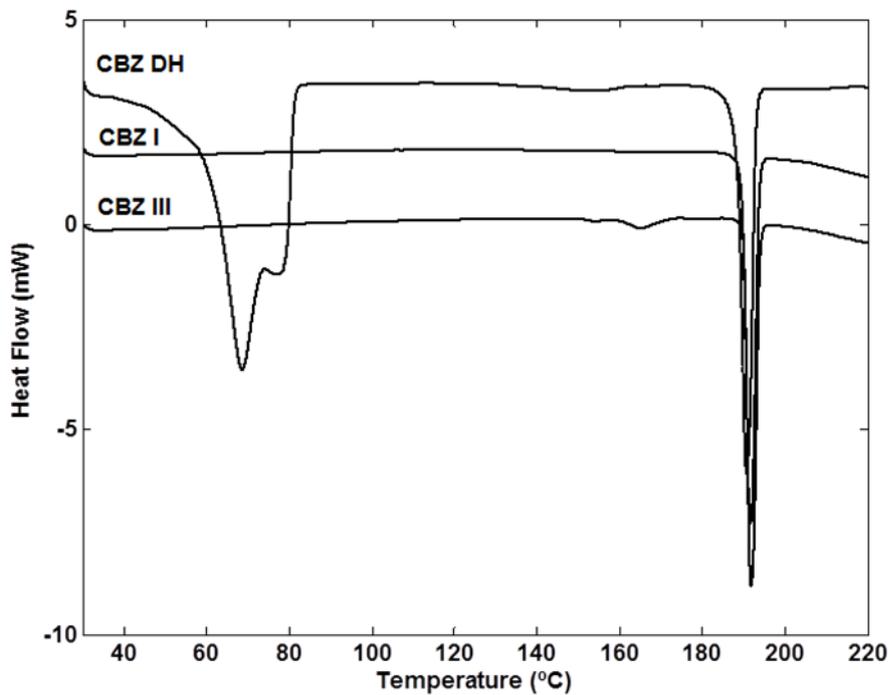
quantificação de fase amorfa também é problemática devido ao fato de que esta fase não apresenta padrão de difração. Outro problema está relacionado a orientação preferencial que pode ocorrer nas amostras. A orientação preferencial é decorrente de um empacotamento preferencial dos cristais de uma amostra, em uma determinada posição, que faz com que determinados ângulos sejam mais ou menos difratados. Isso altera as intensidades dos picos no difratograma podendo, por vezes, até suprimi-los⁸¹. Todos esses apontamentos podem levar à erros de quantificação por DRX.

Os resultados do DSC, apresentados na Figura 3. 1b, mostram o perfil térmico das três formas polimórficas de carbamazepina. Mais uma vez comparando esses resultados com os presentes na literatura, fica confirmado que os três polimorfos de carbamazepina (CBZ I, CBZ III e CBZ DH) foram sintetizados corretamente. Muito embora o DSC seja uma técnica extremamente importante para análise de polimorfos, a análise de misturas de polimorfos é mais difícil já que durante as análises, com o aumento da temperatura, os polimorfos sofrerão transições, podendo ocorrer a fusão de algum deles e esta fase fundida pode levar a solubilização de toda amostra, ou ainda ocorrer a transição de uma forma menos estável para uma forma mais estável. Ambos acontecimentos levariam a conclusões erradas sobre polimorfismo na amostra⁸². Na Figura 3. 1b, a transformação do dihidrato para a forma I e III é observada⁸³, causando eventos térmicos ao redor de 70 e 80 °C. Na carbamazepina forma III, dois picos, por volta de 160°C e 165°C indicam a transição para a forma I. O mesmo processo ocorre com a forma dihidratada por volta de 155°C. Na carbamazepina dihidratada os dois grandes eventos térmicos entre 60 e 80°C estão relacionados à energia necessária para liberação das duas moléculas de água do retículo cristalino^{41,83}.

Capítulo 3- Quantificação simultânea de três polimorfos de Carbamazepina utilizando espectroscopia Raman e análise multivariada.



(a)



(b)

Figura 3. 1: Caracterização das três formas polimórficas de Carbamazepina. (a) difratogramas das análises de raio-x (DRX) e (b) termogramas das análises de calorimetria diferencial exploratória (DSC). Figuras extraídas da referência⁸⁴.

A Figura 3. 2 mostra os espectros Raman para os três polimorfos de carbamezpina. Dentre a faixa espectral de 300 a 800 cm^{-1} é possível observar grupos de picos que são diferentes entre si de polimorfo para polimorfo, o que confirma que os espectros Raman são únicos para cada polimorfo. Logo, com o uso das ferramentas quimiométricas esses espectros podem ser facilmente diferenciados entre si.

A espectroscopia Raman pode coletar espectros de áreas tão pequenos quanto 1 μm , dependendo da sonda utilizada. Essa característica permite estudos de um único cristal no estudo de polimorfismo de princípio ativos. Porém essa mesma característica, em procedimentos quantitativos, pode levar a erros de quantificação por conta da micro heterogeneidade^{76,85,86}. Uma alternativa é realizar uma média de 10 espectros da amostra e utilizar esse “espectro médio” como o espectro representativo da amostra. Outro problema da espectroscopia Raman envolve mudanças na intensidade do espalhamento, causados pela diferenças de tamanho de partículas dos polimorfos⁸⁶. Por essa razão os espectros foram normalizados pela área para dar aos espectros o mesmo peso e manter a relação entre os picos, tanto nos espectros individuais como nos espectros médios⁸⁵.

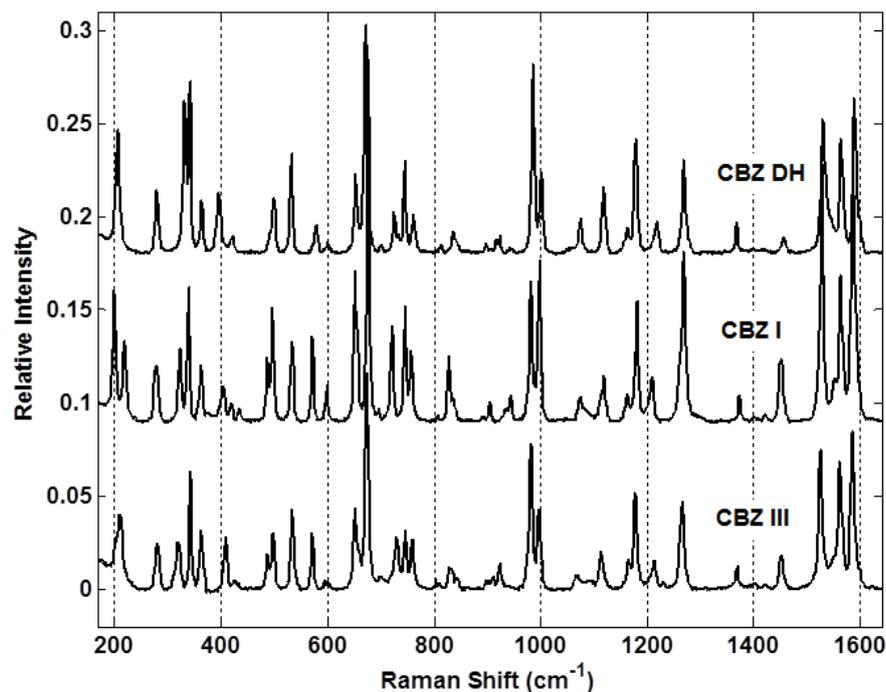


Figura 3. 2: Espectros Raman para as três formas polimórficas de carbamazepina. Figura extraída da referência⁸⁴.

As amostras foram preparadas de acordo com um planejamento ternário descrito na parte de materiais e métodos. A regressão multivariada do tipo iPLS foi construída com 10 amostras de calibração e 5 amostras de validação, utilizando-se seleção de variáveis. Foram avaliados diferentes pré-tratamentos no conjunto de dados antes de construir o modelo iPLS, como descrito na Tabela 3- 1. O número de variáveis latentes escolhidas pelo modelo é importante para obtenção de informação relevante, uma vez que ao selecionar um número maior de variáveis do que o necessário ocorrerá um sobreajuste do modelo, onde os erros de calibração serão pequenos mas os erros de predição não serão da mesma magnitude, demonstrando que os valores do modelo não correspondem a realidade^{85,87}.

Os melhores resultados foram obtidos utilizando-se 3 variáveis latentes, como esperado, uma vez que o número de polimorfos também é três.

As amostras de validação foram testadas em sequência e os valores dos parâmetros obtidos estão descritos na Tabela 3- 2. As amostras de validação pertencem a uma nova síntese de polimorfos, sendo assim o conjunto de calibração demonstra capacidade de prevêr novas sínteses, o que demonstra a robustez do modelo.

Os valores na Tabela 3- 2 demonstraram valores de predição com erros (RMSEP) de predição de 11,6% para os dihidratos de carbamazepina e erros entre 6 e 7% para para os polimorfos I e III. Os erros de predição estão muito próximos dos erros de calibração por validação cruzada (RMSECV), demonstrando que o modelo não apresenta sobreajuste. O polimorfo dihidratado é aquele que apresentou maior erro(11,6%), mas ao se observar a Figura 3. 3, ítem (c), vê-se que o valor foi influenciado por uma amostra anômala e que todas as outras amostras apresentam resíduos (diferença entre o valor calculado pelo modelo e o valor real do polimorfo na amostra) baixos. O modelo de calibração construído com apenas 10 amostras, baseado em um planejamento ternário, é um modelo capaz de calcular as possíveis concentrações de 3 polimorfos que podem surgir em uma linha de produção. Os valores reais comparados aos valores preditos estão apresentados na Figura 3. 3. Considerando que nesse conjunto de calibração cada amostra tem, no mínimo, 10 mg para cada polimorfo, o erro médio de predição (RMSEP) para os polimorfos I e III é da ordem de 0,6 e 0,7 mg, respectivamente, e de aproximadamente 1,2 mg para o dihidrato de carbamazepina.

Tabela 3- 2: Parâmetros analíticos e de calibração da regressão PLS por seleção de variáveis.

Parâmetros	Polimorfos		
	Carbamazepina forma I ^{a,b,c}	Carbamazepina forma III ^{a,b,d}	Carbamazepina dihidrato ^{a,e}
RMSEC(%)	6,51	5,50	6,71
RMSECV(%)	7,99	8,60	9,89
RMSEP(%)	6,18	6,84	11,6
R ²	0,98	0,94	0,92

^a normalizado (área=1).

^b primeira derivada (suavização de ordem 4, janela de 15 pontos). Intervalos usados na calibração em cm⁻¹.

^c 392-486, 1253-1282, 1430-1457.

^d 428-480, 893-940, 990-1036, 1085-1130, 1357-1400, 1654-1693.

^e 392-462; 876-1004; 1654-1706.

A análise dos erros de predição deve levar em conta a característica da técnica bem como o modo como a análise foi feita. A espectroscopia Raman é constituída por um microscópio que direciona o feixe do laser monocromático à superfície da amostra. Geralmente o laser possui uma área de análise de 1mm², e atinge uma profundidade de alguns poucos décimos de milímetros, logo a informação coletada em cada espectro se refere a um volume de amostra muito pequeno quando comparado ao tamanho da amostra como um todo. A análise foi realizada coletando-se espectros Raman de 10 pontos distintos da superfície da amostra e realizando-se uma média aritmética desses espectros, que se tornou o espectro representativo da amostra no conjunto de calibração.

Outra informação importante se refere à natureza da mudança de sinal Raman exibida nos espectros. Um polimorfo de uma molécula é apenas uma conformação tridimensional, dessa mesma molécula, que pode ser assumida pelo cristal formado. Logo, a espectroscopia Raman consegue diferenciar (obter um espectro diferente com bandas diferentes) para uma mesma molécula com conformação do cristal distinta, por vezes os espectros podem ser bem diferentes entre si, da mesma maneira pode ser que a diferença não seja muito acentuada. Dessa forma o erro obtido no modelo leva em consideração tanto a pouca mudança das bandas espectrais obtidas entre os diferentes polimorfos, como o pequeno volume de amostra analisado frente ao volume total da amostra.

Capítulo 3- Quantificação simultânea de três polimorfos de Carbamazepina utilizando espectroscopia Raman e análise multivariada.

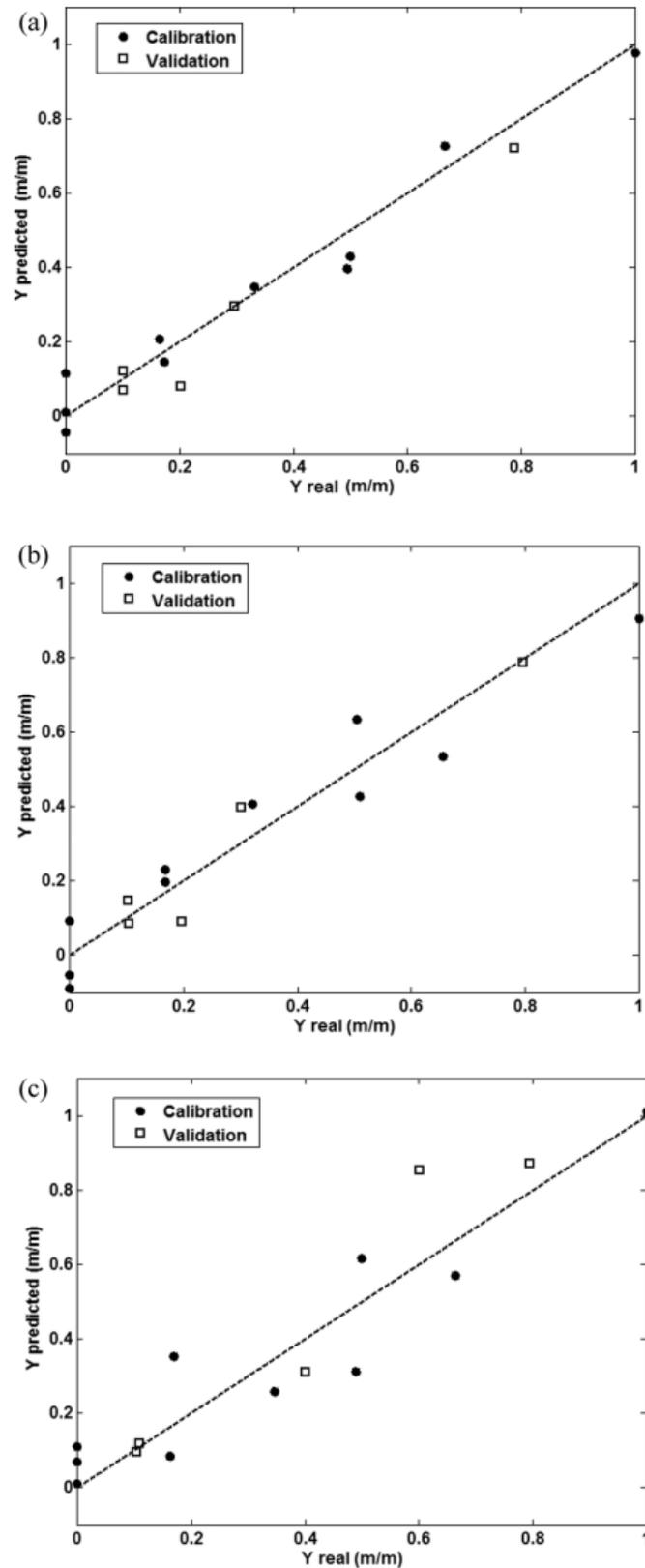


Figura 3. 3: Valores reais vs valores preditos pelo modelo para os polimorfos de carbamazepina: a) forma I, b) forma III, c) forma dihidratada.

3.4. Conclusões.

Com os problemas de biodisponibilidade de princípios ativos causados por polimorfismo, tanto a indústria farmacêutica como as agências regulatórias precisam de métodos analíticos capazes de analisar mistura de polimorfos. A espectroscopia Raman aliada a métodos de análise multivariada, como PLS, tem demonstrado capacidade de atender a essa necessidade. O modelo de calibração demonstrou resultados com erros de predição baixos, dá ordem de 0,5 mg para 10 mg de um polimorfo presente na amostra. Em uma aplicação real, os erros de predição podem ser diminuídos utilizando um número maior de amostras e replicatas para o conjunto de calibração, atenuando o problema de micro heterogeneidade.

Os resultados de caracterização por DSC demonstraram que essa técnica não é adequada para fins quantitativos de misturas polimórficas, já que transições podem ocorrer durante a análise, sendo mascarada por outro evento térmico. Em análises de DRX a intensidade do sinal do espectro de um polimorfo pode variar com o tamanho de partícula da amostra, portanto quantificação por DRX não é recomendada quando há uma variabilidade no tamanho de partícula que pode ocorrer entre lotes distintos.

**CAPÍTULO 4- QUANTIFICAÇÃO
SIMULTÂNEA DE TRÊS FORMAS
POLIMÓRFICAS DE CARBAMAZEPINA NA
PRESENÇA DE EXCIPIENTES,
UTILIZANDO ESPECTROSCOPIA RAMAN**

4. Quantificação simultânea de três formas polimórficas de carbamazepina na presença de excipientes utilizando espectroscopia Raman.

* Capítulo publicado: Farias, Marco; Carneiro, Renato Lajarim. Simultaneous Quantification of Three Polymorphic Forms of Carbamazepine in the Presence of Excipients Using Raman Spectroscopy. *Molecules*, v. 19, p. 14128-14138, 2014.

4.1. Introdução

Como descrito no trabalho de Bauer *et.al.*³: “Polimorfismo é a habilidade de um composto químico existir em mais de uma forma cristalina com diferentes parâmetros unitários de célula”. O princípio ativo de uma formulação pode existir em diferentes formas polimórficas as quais apresentarão diferenças em algumas propriedades como ponto de fusão, reatividade química, solubilidade aparente, taxa de dissolução, entre outras^{4,75}. O reconhecimento da indústria farmacêutica sobre a importância do polimorfismo iniciou-se em 1969 quando Walter McCrone publicou uma revisão intitulada *pharmaceutical application of Polymorphism*⁵. Porém a transição polimórfica ocorrida no produto comercial conhecido como Norvir (ritonavir) foi o ponto culminante que chamou a atenção da indústria farmacêutica e das agências reguladoras para o tema, obrigando-os a rever os procedimentos de controle de qualidade utilizados até o momento^{3,7}.

A maioria dos fármacos é formulado e administrados em estado sólido², como comprimidos ou capsulas. Uma grande variedade de tais fármacos pode apresentar transições polimórficas, afetando a qualidade do fármaco comercializado, especialmente quando a taxa de dissolução é afetada⁸⁸.

Dentre os produtos que apresentam problemas com transições polimórficas, os que contêm carbamazepina estão entre os mais problemáticos, apresentando histórico de performance irregular e falha na aplicação clínica^{44,83,89-91}. Um estudo conduzido por Meyer *et. al.*⁴³ demonstrou que a variabilidade na taxa de dissolução dos comprimidos de carbamazepina é bem alta, mesmo em produtos da mesma marca. De acordo com o BCS⁹² a carbamazepina está classificada no grupo 2 o que significa que a mesma apresenta baixa solubilidade em água e alta permeabilidade em tecidos humanos. Dessa forma, a absorção da carbamazepina é determinada pela taxa de dissolução dessa no organismo e qualquer possível transição polimórfica pode afetar a sua solubilidade significativamente. Um estudo de Kobayashi *et.al.*⁴² demonstrou que a taxa de dissolução da carbamazepina forma I e dihidratada é menor do que a taxa de dissolução da carbamazepina forma III. O mesmo estudo demonstra que a

Capítulo 4- Quantificação simultânea de três formas polimórficas de carbamazepina na presença de excipientes utilizando espectroscopia Raman.

carbamazepina forma III (comercializada em comprimidos) pode se converter para a forma dihidratada em 2 semanas sob as condições de 40°C e uma atmosfera com 98% de humidade relativa. Tais informações revelam uma necessidade de se saber quais polimorfos se encontram nos comprimidos de carbamazepina.

O guia para polimorfismo em fármacos da FDA⁴ indica algumas técnicas analíticas para determinar polimorfismo em fármacos e uma revisão feita por Chieng *et.al.*¹⁶ revela que pelo menos duas técnicas analíticas de estado sólido foram utilizadas para determinação de polimorfismo, mas geralmente são utilizados quatro técnicas. Dentre as técnicas utilizadas para determinação de polimorfismo a difração de raio-x (DRX) é a mais utilizada. Porém, a DRX apresenta alguns problemas quando utilizada para fins quantitativos de mistura de polimorfos. Um dos problemas é referente a distribuição do tamanho de partícula (cristalinidade) da amostra, se o tamanho das partículas é muito pequeno ocorrerá um alargamento dos picos e um decréscimo do sinal do difratograma e essa característica da técnica é indesejável para fins de quantificação. Em algumas ocasiões é importante que um determinado princípio tenha um tamanho de partícula tão pequeno quanto possível, pois dessa forma pode-se aumentar a taxa de dissolução de um princípio ativo pouco solúvel, já que a área superficial da partícula será aumentada. Sendo assim a DRX pode ser uma técnica impropria para esse tipo de aplicação, muito embora a DRX tenha sido utilizada para determinação de misturas de polimorfos⁸⁶. Em formulações comercializadas (comprimidos) o princípio ativo é misturado aos seus excipientes e sofre uma compressão em moldes para chegar ao seu formato final. Os excipientes também possuem hábitos cristalinos diferentes com tamanhos de partículas diferentes, que produzirá um difratograma muito complexo, apresentando diversos picos, diminuindo a capacidade da técnica em ser sensível frente ao sinal do princípio ativo. Além desses problemas anteriormente descritos há ainda a questão da orientação preferencial⁸¹.

Outra técnica analítica para determinação de polimorfos é a calorimetria diferencial exploratória (DSC) que monitora os eventos térmicos devidos as transições polimórficas. Essa técnica é utilizada para caracterização de polimorfos porque no decorrer de transições polimórficas é possível quantificar quanta energia é necessária para que tal transição ocorra e dessa forma determinar a estabilidade térmica dos polimorfos. Contudo, quando na amostra analisada há mistura de polimorfos, as transições que ocorrem em um polimorfo podem induzir uma transição no outro polimorfo, podendo ocorrer até mesmo uma

Capítulo 4- Quantificação simultânea de três formas polimórficas de carbamazepina na presença de excipientes utilizando espectroscopia Raman.

usão que solubilizaria toda a amostra, mascarando totalmente os eventos térmicos decorrentes das transições polimórficas^{82,93}.

Técnicas espectroscópicas como infravermelho (IR), Raman e ressonância magnética nuclear em estado sólido (ssNMR, do inglês *solid state nuclear magnetic resonance*), tem apresentados resultados muito relevantes na análise de características físicas de substâncias. Como já discutido por Bugay *et.al.*³³ a escolha da técnica analítica utilizada para quantificação dependerá de suas limitações que em sua maioria está associado ao preparo de amostras. IR com Reflectância total atenuada (ATR) é uma das técnicas analíticas para estado sólido que quase não precisa de preparo de amostra, já que é necessário apenas colocar a amostra em contato com o cristal do ATR. Porém, essa análise coleta apenas espectros da superfície do material, o feixe de radiação infravermelha não penetra mais que 10 µm na amostra. Outro problema na utilização de IR para análise de formulações comercializadas está na própria regra de seleção da técnica. Excipientes geralmente apresentam forte absorção em espectroscopia IR devido à presença de ligações com forte momento de dipolo. Por outro lado, na espectroscopia Raman, os princípios ativos possuem sinal mais intenso que os excipientes, característica essencial já que, na maioria das vezes, os comprimidos possuem maior quantidade de excipientes do que princípio ativo. A espectroscopia Raman não é sensível a ligações químicas com forte momento de dipolo, como na maioria dos excipientes e água, mas é altamente sensível a duplas ligações conjugadas, anéis aromáticos e outras estruturas presentes nos princípios ativos.

Contudo a espectroscopia Raman também apresenta suas limitações: a intensidade de sinal pode ser influenciada pelo tamanho de partícula⁷⁶ e amostras que contenham alguma coloração podem se aquecer ao entrar em contato com o feixe de laser, produzindo um espectro de baixa qualidade devido ao fundo de radiação térmica, podendo queimar a amostra, ou induzir uma transição polimórfica *in loco*. Por fim, como a sonda coleta espectros de uma área muito pequena, a micro heterogeneidade pode ser um problema nas análises. No entanto, alguns procedimentos podem minimizar esse problema, como a obtenção de vários espectros que serão utilizados para o cálculo de uma média, representada por um espectro. Outro problema está no tamanho dos cristais obtidos na síntese dos polimorfos, alguns cristais podem ser maiores que outros e uma homogeneização dos tamanhos pode ocorrer por meio do uso de almofariz e pistilo, tal procedimento somente pode ser empregado quando não ocorre transição polimórfica.

Capítulo 4- Quantificação simultânea de três formas polimórficas de carbamazepina na presença de excipientes utilizando espectroscopia Raman.

Estudos anteriores demonstraram ser possível a determinação simultânea de três polimorfos de carbamazepina em produtos puros utilizando espectroscopia Raman^{80,84}. Contudo, mesmo utilizando o polimorfo III de carbamazepina para produção dos comprimidos a transição polimórfica pode ocorrer durante a manipulação realizada na linha de produção, e então é necessário realizar análise ao final do processo de produção para avaliar se ocorreu alguma transição em processo. Tal transição é ainda mais provável de ocorrer no processo de granulação úmida, onde água é adicionada ao processo para a formação dos granulos e essa mistura é colocada em um leito fluidizado, onde ocorrerá a secagem seguido do processo *Kiln drying*, onde a umidade é retirada por troca de calor por meio de correntes de ar quente. Neste caso a formação do hidrato pode ocorrer pela adição de água ao processo e o polimorfo I pode ocorrer devido a troca de calor com as correntes de ar quente. Ademais, mesmo quando o processo via úmida não ocorre, utilizando-se o processo por compressão direta, as transições polimórficas podem ocorrer por conta da transferência de umidade entre excipientes e princípio ativo.

Nesse estudo foi utilizado espectroscopia Raman como técnica analítica para quantificação de três polimorfos de carbamazepina (I, III e dihidratada) na presença de excipientes em comprimido feitos em laboratório. Para quantificação foi utilizado PLS como modelo de calibração multivariada. Em cada comprimido há apenas 16,67% de carbamazepina em massa, sendo o restante do comprimido de excipientes (celulose microcristalina, croscamelose sódica, estearato de magnésio, dióxido de silício coloidal), cada comprimido continha 50 mg de carbamazepina.

4.2. Materiais e métodos.

4.2.1. Síntese dos polimorfos.

O polimorfo III (CBZIII) foi gentilmente cedido por uma companhia farmacêutica local. O polimorfo I foi preparado pesando-se 1g de CBZ III e deixando-o na estufa por 2 horas a 170 °C. A forma dihidratada (CBZ DH) foi preparada pesando-se 1g de CBZ III e adicionando água ultrapura à essa amostra até que estivesse totalmente submersa, seguida por secagem a temperatura ambiente por 3 dias.

Capítulo 4- Quantificação simultânea de três formas polimórficas de carbamazepina na presença de excipientes utilizando espectroscopia Raman.

4.2.2. Caracterização dos polimorfos.

Os três polimorfos de carbamazepina foram caracterizados por, DRX e DSC. o difratômetro de raio-x foi um Rigaku Dmax 2500PC (Tóquio, Japão) com fonte de Cobre (comprimento de onda de 0,154 nm) com voltagem de 40 kV e corrente de emissão de 40 mA. As amostras foram analisadas na faixa de 5° até 45° (2 θ) com velocidade de varredura de 0,2° min⁻¹. Para as análises térmicas foi utilizado um aparelho Shimadzu DSC-60 (kyoto, Japão), com uma rampa de aquecimento de 10°C min⁻¹ em atmosfera de Hélio e faixa de temperatura de 30°C até 220°C. Para as análises com espectroscopia Raman utilizou-se um aparelho B&W Tek *i*-Raman modelo BWS 415-785H (Newark, New Jersey, USA) acoplado a um microscópio BAC151, com fonte de laser de 785 nm, resolução espectral de 3,5 cm⁻¹, faixa espectral de 52-1708 cm⁻¹, tempo de aquisição de 30 segundos, potência de laser de 31,6 mW e lente objetiva de 20x.

4.2.3. Preparação dos comprimidos.

Para preparação dos comprimidos foi necessário buscar informações à respeito dos excipientes comumente utilizados nas formulações. Para isso consultou-se um grupo de bulas de comprimidos de carbamazepina. Os quatro excipientes mais utilizados são: celulose microcristalina, croscamelose sódica, dióxido de silício coloidal e estearato de magnésio. As proporções utilizadas nos comprimidos não são mencionadas nas bulas. Portanto foi necessário consultar o *Handbook of pharmaceutical excipients*⁹⁴ para encontrar as proporções dos excipientes aceitas em uma formulação. Nesse trabalho 16,67% em massa de carbamazepina (mistura dos polimorfos) foi utilizada em cada comprimido e os 83,33% restantes foram de excipientes distribuídos na seguinte razão: celulose microcristalina (74,17%), croscamelose sódica (4,17%), dióxido de silício coloidal (0,83%) e estearato de magnésio (4,17%). Cada comprimido constituído por um total de 300 mg, sendo 50 mg de carbamazepina e 250 mg de excipientes.

A mistura de polimorfos foi adicionada em cada comprimido de acordo com um planejamento ternário, totalizando 10 amostras de calibração e outras 5 amostras de validação de acordo com a Tabela 4- 1. O número relativamente baixo de amostras se deve ao fato de que existe somente três fontes de variação entre as amostras, que são os três polimórfos, já que a concentração de excipientes é constante em todas amostras.

Capítulo 4- Quantificação simultânea de três formas polimórficas de carbamazepina na presença de excipientes utilizando espectroscopia Raman.

As amostras foram homogeneizadas utilizando um almofariz, pressionadas com o auxílio de um pastilhador de 13 mm, com pressão de 1 tonelada.

Tabela 4- 1: Massa em miligramas dos polimorfos de carbamazepina em mg, para as amostras de calibração e validação. Em parênteses a porcentagem em massa de cada polimorfo na amostra.

		Polimorfos de carbamazepina		
Amostras		CBZ I	CBZ III	CBZ DH
Conjunto de calibração.	1	49,4	0	0
	2	0	50	0
	3	0	0	50,8
	4	25,3 (50%)	25,2 (50%)	0
	5	25,2 (50,5%)	0	24,7 (49,5%)
	6	0	25,1 (50,2%)	24,9 (49,8%)
	7	34,3 (67,8%)	8,1 (16,1%)	8,2 (16,1%)
	8	7,9(15,6%)	34,3 (68%)	8,3 (16,4)
	9	8,2 (16,4%)	8,0 (16%)	33,9 (67,6%)
	10	16,4 (33,5%)	16,2 (33%)	16,4 (33,5%)
Conjunto de validação.	1	40,2 (79,8%)	5,2 (10,3%)	5,0 (9,9%)
	2	5,1 (10,2%)	40 (79,8%)	5,0 (10%)
	3	5,1 (10,15%)	5,1 (10,15%)	40 (79,7%)
	4	30 (59,2%)	10,6 (20,9%)	10,1 (19,9%)
	5	10,2 (20,5%)	29,8 (59,8%)	9,8 (19,7%)

4.3. Aquisição e tratamento dos dados.

Foram adquiridos 10 espectros Raman de cada amostra em diferentes pontos da superfície do comprimido. Esses espectros foram utilizados para calcular um espectro médio, após normalização individual, representativo da amostra. Esse procedimento é necessário para minimizar os problemas relacionados a micro heterogeneidade da amostra devido ao pequeno tamanho de área sensibilizada pelo laser.

Capítulo 4- Quantificação simultânea de três formas polimórficas de carbamazepina na presença de excipientes utilizando espectroscopia Raman.

O espectro médio de cada amostra foi normalizado e derivado (primeira derivada). Os espectros médios das amostras de calibração foram utilizados para construir um modelo de regressão e os espectros médios das amostras de validação foram utilizados para testar o poder de predição do modelo de regressão.

4.4. Resultados e discussão.

Inicialmente os polimorfos de carbamazepina foram caracterizados por DRX e DSC⁸⁴. As informações contidas nas análises confirmam que os polimorfos foram sintetizados corretamente^{41,84}. Depois da confirmação dos polimorfos os comprimidos foram preparados e as análises por espectroscopia Raman foram feitas. Em seguida foram utilizadas duas ferramentas de pré-tratamento dos dados: primeiramente os dados foram normalizados e posteriormente foi feita a primeira derivada dos espectros normalizados. Quando os dados são normalizados retira-se a influência das oscilações de intensidade de sinal que podem ocorrer nas análises. Já a derivação dos espectros (primeira derivada) melhora a qualidade do conjunto de dados pois nesse processo um pico dá surgimento a dois picos, ou seja, a derivada de uma determinada banda espectral faz com que a banda de origem a duas bandas, uma com valores positivos e outra com valores negativos; o que auxilia na identificação (diferenciação) de picos muito próximos, deixando o conjunto de calibração com melhor qualidade⁶⁶. Um modelo de regressão do tipo iPLS foi construído. Nesse tipo de modelo de regressão apenas os intervalos de variáveis mais discriminativos, com maior variância, são utilizados. Esse tipo de abordagem é muito valioso pois elimina variáveis não lineares, ruídos, e variáveis que não estão relacionadas à discriminação dos polimorfos.

A Figura 4. 1 apresenta o RMSECV de cada modelo por variáveis latentes. É possível notar que após a terceira variável latente os erros apresentam comportamento aleatório e que o erro mínimo se apresenta com 3 variáveis latentes (99,59% da variância total dos dados). Logo utilizou-se três variáveis latentes para construção do modelo de calibração.

Capítulo 4- Quantificação simultânea de três formas polimórficas de carbamazepina na presença de excipientes utilizando espectroscopia Raman.

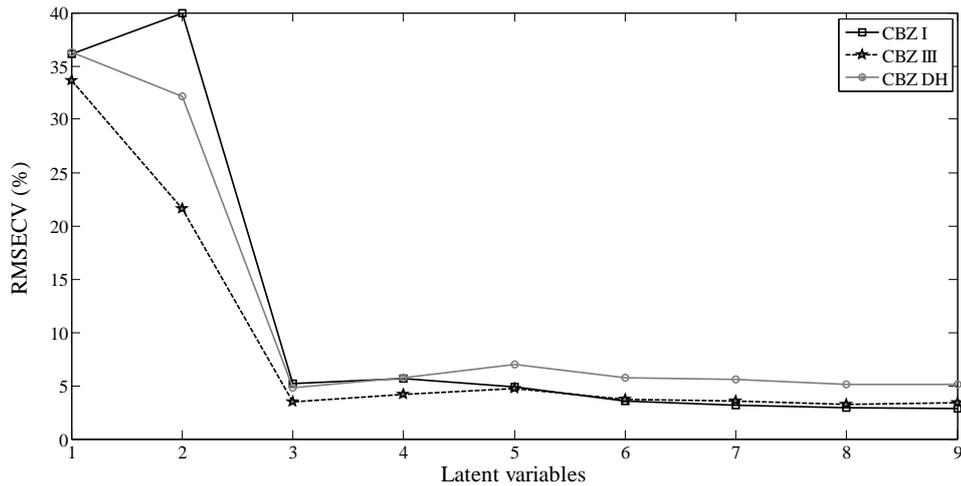


Figura 4. 1:RMSECV (%) por variáveis latentes para cada modelo.

Vale a pena enfatizar que a escolha de três variáveis latentes pelo modelo de calibração já era esperado, uma vez que as variações espectrais ocorrerão por conta da variação da concentração dos polimorfos nas amostras, os excipientes não mudam sua composição e possuem concentração constante.

A Figura 4. 2 mostra os espectros Raman dos comprimidos para os polimorfos puros, onde é possível observar que os mesmos apresentam padrões próprios, demonstrando que cada uma das amostras puras CBZ I, CBZ III e CBZ DH, possui espectros diferentes. Porém, isso não implica que o modelo de iPLS irá escolher exatamente intervalos onde a diferença é perceptível. A quantificação utilizando iPLS é possível por causa do padrão único de cada espectro e porque a variação entre os espectros médios dos comprimidos está diretamente relacionada à mudança na proporção dos polimorfos em cada comprimido.

A Figura 4. 3 mostra a correlação entre os valores de concentração real e os valores de concentração preditos pelo modelo, calculado por iPLS, para os três polimorfos. O coeficiente de determinação (R^2) para o modelo de calibração dos polimorfos está presente na Tabela 4- 2, onde também estão presentes os valores para erros de validação cruzada (RMSECV) e erro de predição para amostras de validação (RMSEP).

Capítulo 4- Quantificação simultânea de três formas polimórficas de carbamazepina na presença de excipientes utilizando espectroscopia Raman.

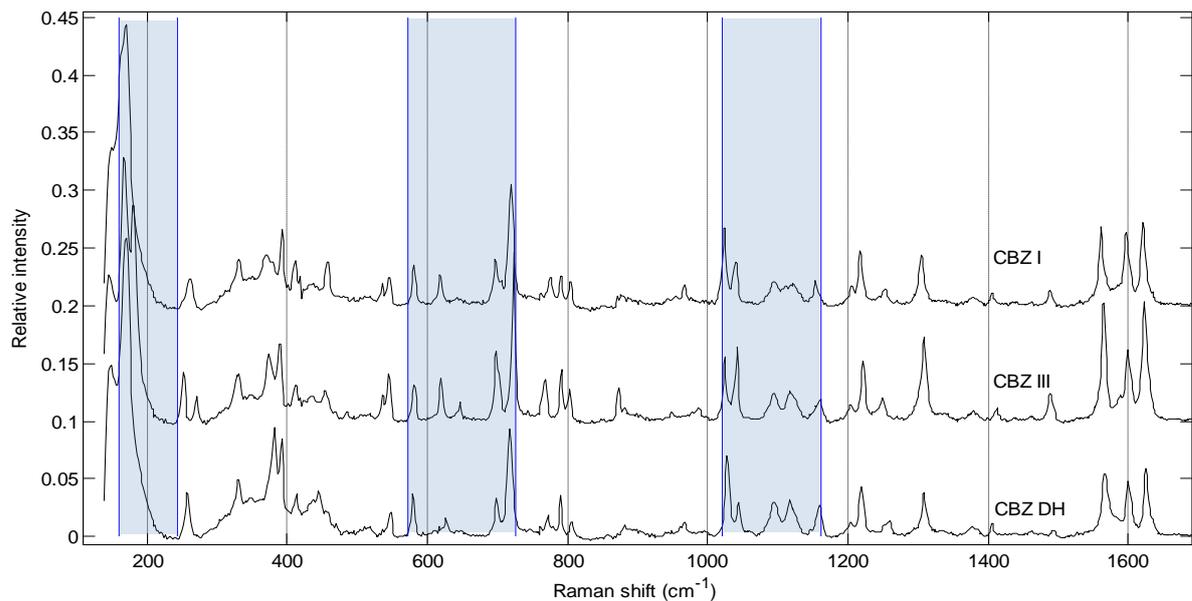


Figura 4. 2: Espectro Raman de amostras de polimorfos puros. Em azul os intervalos selecionados pelo modelo iPLS em cm^{-1} , 160 a 244; 572 a 726 e 1021 a 1162.

CBZ I apresenta o maior erro de predição (RMSEP) dentre os polimorfos, o valor é de 9,49%, como pode ser visto na Tabela 4- 2 os valores de RMSECV e RMSEP são próximos entre si, demonstrando que o modelo de regressão é capaz de prevêr novas amostras. Os valores de R^2 mostram que os valores residuais do modelo são muito pequenos, o que significa que os valores preditos pelo modelo são muito próximos dos valores reais, logo o modelo tem boa capacidade de predição.

Tabela 4- 2: Parametros para o modelo de iPLS para espectroscopia Raman (% massa/massa).

Parametros	Polimorfos		
	CBZ I	CBZ III	CBZ DH
RMSEC	3.38 (0.56)	2.30 (0.38)	3.02 (0.50)
RMSECV	5.19 (0.86)	3.49 (0.58)	4.82 (0.80)
RMSEP	9.49 (1.58)	6.27 (1.04)	1.34 (0.22)
R^2	0.965	0.994	0.999

Notas: intervalos utilizados no modelo: [160–244, 572–726 e 1021–1162] cm^{-1} ; Pre-tratamento: Normalizado pela área, 1ª derivada; Erros considerando a massa do polimorfo relacionado a massa total de carbamazepina; Em parenteses os erros considerando a massa do polimorfo relacionado a massa total do comprimido.

Os valores de erro de predição (RMSECV) para a CBZ I (9,49%) e para CBZ III (6,27%) foram maiores do que os valores para CBZ DH (1,34%), como descrito na Tabela

Capítulo 4- Quantificação simultânea de três formas polimórficas de carbamazepina na presença de excipientes utilizando espectroscopia Raman.

4- 2. Tal diferença foi causada por conta do alto valor de predição de uma única amostra do modelo: a primeira amostra de validação para CBZ I e a última amostra de validação para CBZ III. A amostra pode ser vista na Figura 4. 3 (no meio e a direita). Contudo o erro poderia ser diminuído se mais espectros fossem obtidos da amostra (nesse trabalho foram obtidos 10 espectros por amostra, sobre os quais se calculou a média aritmética, dando origem a um espectro médio, representante da amostra). Complementando, o problema do alto valor de predição pode ter ocorrido devido a falta de homogeneidade dos polímeros nestas amostras.

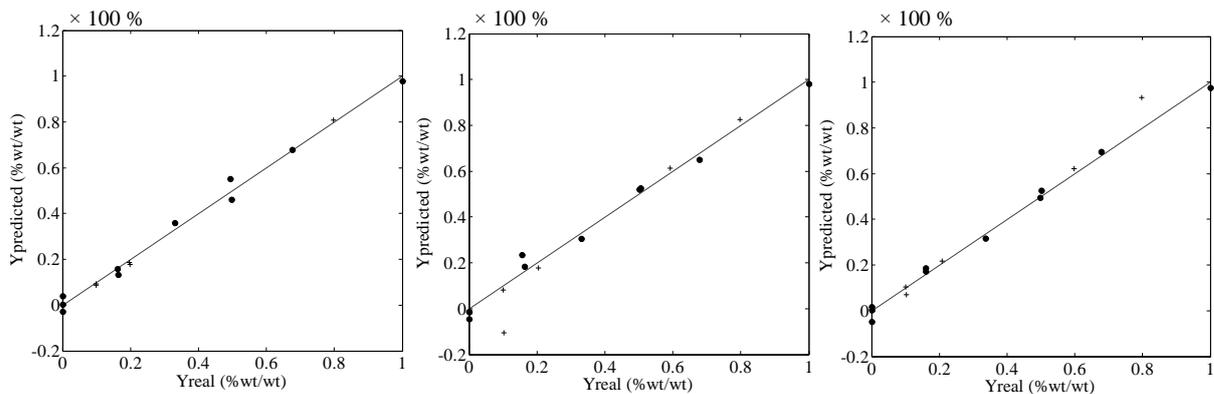


Figura 4. 3: Valores reais \times valores preditos para CBZ DH (esquerda), CBZ I (meio) e CBZ III (direita). Os valores em porcentagem consideram a massa do polímero relacionado a massa total de carbamazepina. (•) amostras de calibração; (+) amostras de validação.

Nesses comprimidos, produzidos em laboratório, a concentração total de carbamazepina foi de 16,67% (50 mg de carbamazepina para 250 mg de excipientes), portanto se toda a massa do comprimido for considerada o maior valor de erro de predição (CBZ I) será de 1,58%. Logo, na presença de excipientes para um comprimido de 50 mg de carbamazepina, seria possível prever a concentração desse polímero específico (CBZ I) com um erro de aproximadamente 2%, lembrando que este é o maior valor de erro de predição para o modelo.

4.5. Conclusões.

A espectroscopia Raman associada à calibração multivariada gerou baixos erros de predição para os três polímeros de carbamazepina na presença de seus excipientes mais comuns, com valores de erro de predição por volta de 2% relacionado à massa total do comprimido. Considerando que os comprimidos de carbamazepina podem ter uma formulação

Capítulo 4- Quantificação simultânea de três formas polimórficas de carbamazepina na presença de excipientes utilizando espectroscopia Raman.

próxima àquela utilizada neste trabalho, pode-se dizer que a abordagem feita para a determinação de polimorfismo em produtos comercializados pode ser bem atrativa para a indústria farmacêutica, bem como para as agências regulatórias, uma vez que os resultados obtidos possuem bom limite de detecção, baixo erro de predição e o aparelho utilizado pode ser portátil. Especificamente para o caso dos comprimidos de carbamazepina onde as relações entre princípio ativo e excipientes podem ser maiores (existem comprimidos com 100mg ou mais de carbamazepina), o modelo poderia obter resultados ainda melhores.

**CAPÍTULO 5- MONITORAMENTO DA
FORMAÇÃO DO MONOHIDRATO DE
EZETIMIBA, PROMOVIDO PELA UMIDADE
DOS EXCIPIENTES, POR MEIO DE
ESPECTROSCOPIA RAMAN E
FERRAMENTAS QUIMIOMÉTRICAS.**

Capítulo 5- Monitoramento da formação do monohidrato de Ezetimiba, promovido pela umidade dos excipientes, por meio de espectroscopia Raman e ferramentas quimiométricas.

5. Monitoramento da formação do monohidrato de Ezetimiba, após embalamento, causado pela umidade dos excipientes, por meio de espectroscopia Raman e ferramentas quimiométricas.

* Capítulo submetido para publicação (na ocasião da defesa): Marco Antônio dos Santos Farias, Frederico Luis Felipe Soares, Renato Lajarim Carneiro. Crystalline phase transition of ezetimibe in final product, after packing, promoted by the humidity of excipients: monitoring and quantification by Raman spectroscopy. *Journal of Pharmaceutical and biopharmaceutical analysis*. Under evaluation.

5.1. Introdução e objetivos.

A mudança na forma cristalina de um princípio ativo é um fenômeno de grande importância devido às possibilidades de tais mudanças alterarem as propriedades físicas e químicas dos princípios ativos, tais como: ponto de fusão, solubilidade aparente, densidade, entre outras⁷⁵. Contudo, para as indústrias farmacêuticas, o que causa maior preocupação nas conversões de formas cristalinas é quando esta afeta a taxa de dissolução. A solubilidade final de um princípio ativo não é alterada por conta de polimorfismo, porém a taxa de solubilidade pode ser alterada. Essa propriedade é determinante para o sucesso do tratamento clínico por uso do fármaco, uma vez que o fármaco possui um tempo de residência no organismo antes de ser eliminado.

Os hidratos geralmente possuem taxas de dissolução menores do que os respectivos anidros⁹⁵ e se tornaram um dos maiores problemas da indústria farmacêutica^{96,97}. Logo se faz necessário um método preciso para o monitoramento de diferentes transições polimórficas que podem surgir durante o manuseio ou produção do princípio ativo. O surgimento de hidratos depende das condições de estocagem, produção do comprimido⁹⁸ e obviamente da tendência da molécula em formar hidratos⁴¹.

A ezetimiba se encontra na classe dos princípios ativos que servem como hipolipemiantes (diminui a absorção de lipídeos) utilizados para controlar os níveis de colesterol no organismo. Está na classe II de acordo com o sistema BCS, isto significa que esse princípio ativo possui baixa solubilidade em água e alta permeabilidade em tecidos humanos^{92,99}. Podem ser encontrados na literatura alguns estudos que tem por objetivo aumentar a solubilidade da ezetimiba no produto comercializado^{47,48}. Como a maioria dos princípios ativos que apresentam uma forma hidratada, o hidrato de ezetimiba também possui uma menor taxa de dissolução em solução aquosa¹⁰⁰.

Capítulo 5- Monitoramento da formação do monohidrato de Ezetimiba, promovido pela umidade dos excipientes, por meio de espectroscopia Raman e ferramentas quimiométricas.

Esse princípio ativo foi aprovado para o tratamento de hipercolesterolemia em 2002 e desde então tem sido vendido com o nome comercial de Zetia® produzido pela companhia Merck e Ezetrol® da companhia Schering- Plough. A ezetimiba é geralmente administrada com outro medicamento, dependendo da necessidade do tratamento e das limitações do paciente. Apesar do tempo que a ezetimiba vem sendo comercializada, estudos sobre as formas cristalinas do princípio ativo ainda são poucos na literatura^{47,101}.

Existem muitas técnicas analíticas sugeridas pela agências regulatórias para análise das formas cristalinas dos princípios ativos. As principais técnicas utilizadas são: DRX, as técnicas espectroscópicas IR e Raman, as análises térmicas como DSC e análise termogravimétrica (TGA do inglês *thermogravimetric analysis*), que são utilizados para análises de hidratos e solvatos, entre outras técnicas⁴. A combinação dessas técnicas pode ser utilizada para caracterizar e quantificar polimorfos. Geralmente as técnicas espectroscópicas, como Raman e IR, precisam ser associadas a técnicas quimiométricas para possibilitar o monitoramento de possíveis mudanças de formas cristalinas e quantificar as misturas polimórficas que podem surgir^{84,98,102}.

A resolução multivariada de curvas por quadrados mínimos alternados (MCR-ALS) é uma ferramenta quimiométrica que permite o monitoramento de transições polimórficas de princípios ativos quando associada a técnicas espectroscópicas¹⁰³. Por definição o MCR-ALS é um método de resolução bilinear que decompõe os dados de uma matriz original (Matriz D que contém os espectros das amostras) em duas outras matrizes, uma matriz C que contém os perfis de concentração dos n componentes presentes na amostra, recuperados pelo modelo, e uma matriz S que contém os perfis espectrais dos componentes relacionados à matriz C⁶¹. Essa ferramenta quimiométrica é muito importante devido a sua capacidade de ser utilizada em associação com técnicas espectroscópicas para monitoramento *in line* de processos industriais⁵⁴. Soares *et. al*⁹³ utilizaram MCR-ALS associada à espectroscopia Raman para monitoramento *in line* da síntese do cocristal de ibuprofeno-nicotinamida.

Outra ferramenta quimiométrica extensivamente utilizada é a regressão por quadrados mínimos parciais (PLS), que torna possível a construção de modelos de regressão multivariada para quantificação de cada forma cristalina (ou fase amorfa) presente em um produto final⁹⁸. PLS é uma das ferramentas quimiométricas mais utilizadas e sua aplicação incluiu uso de dados espectroscópicos de NIR, IR e Raman²⁸. A espectroscopia Raman é uma

Capítulo 5- Monitoramento da formação do monohidrato de Ezetimiba, promovido pela umidade dos excipientes, por meio de espectroscopia Raman e ferramentas quimiométricas.

técnica excelente para análise de com produtos farmacêuticos em estado sólido, já que a maioria dos excipientes possui sinal Raman pouco intenso enquanto que os princípios ativos apresentam boa intensidade de sinal⁵⁴. Além do mais, cada polimorfo ou solvatomorfo apresenta espectro característico, o que é essencial para fins de caracterização e quantificação¹⁰⁴. Portanto a espectroscopia Raman associada à ferramenta quimiométrica PLS é uma excelente estratégia para quantificar as formas cristalinas de um princípio ativo presente em uma formulação⁹⁸.

Nesse trabalho realizou-se um monitoramento da hidratação da ezetimiba em duas condições: usando o princípio ativo puro e em condições ambientes (25°C e umidade relativa de 75%) e em seguida o estudo da hidratação da ezetimiba promovido pelos excipientes em uma formulação. Os estudos foram conduzidos pelo monitoramento do processo de hidratação utilizando espectroscopia Raman, seguido da quantificação das estruturas cristalinas (anidra e hidratada) por meio das ferramentas quimiométricas PLS e MCR-ALS.

5.2. Materias e métodos.

5.2.1. Reagentes.

Todos os reagentes utilizados nesse trabalho: Ezetimiba, croscamelose sódica, lactose monohidratada, povidona e laurilsulfato de sódio foram gentilmente cedidos por uma indústria farmacêutica e foram utilizados da maneira como foram recebidos.

5.2.2. Síntese da EZT-H.

A ezetimiba hidratada (EZT-H) foi sintetizada utilizando a ezetimiba anidra (EZT-An) como precursor. A síntese consiste em deixar a EZT-An em atmosfera com umidade saturada por uma semana. Essa atmosfera foi preparada com o auxílio de dois recipientes de vidro: uma placa de Petri e um becker. Uma quantidade de aproximadamente 200 mg de EZT-An foi alocada na placa de Petri. Em outra placa de Petri foi adicionado água e as duas placas de Petri foram alocadas embaixo do becker de vidro para isolamento.

Capítulo 5- Monitoramento da formação do monohidrato de Ezetimiba, promovido pela umidade dos excipientes, por meio de espectroscopia Raman e ferramentas quimiométricas.

5.2.3. Caracterização da EZT-H, EZT-An e dos excipientes.

EZT-An e EZT-H foram caracterizados por difração de Raio-X (DRX), análises termogravimétricas (TGA). As análises de DRX foram feitas utilizando um difratômetro Rigaku Dmax 2500PC, com fonte de Cobre (comprimento de onda de 0,154 nm), voltagem de 40kV e corrente de emissão de 40 mA. As amostras foram analisadas entre 5° e 45° (2 θ) a uma velocidade de 0,2° por minuto.

As análises termogravimétricas foram feitas utilizando um aparelho de termogravimetria Tarsus 209 F3 (NETZSCH-Gerätebau GmbH, Selb, Alemanha) sob atmosfera de nitrogênio com fluxo de 40 ml.min⁻¹, com rampa de aquecimento de 10°C min⁻¹ e faixa de temperatura de 45°C a 120°C. Nas análises foram utilizados cadinhos de platina e aproximadamente 5,0 mg de amostra.

Para as análises com espectroscopia Raman utilizou-se um espectrometro B&W Tek *i*-Raman modelo BWS 415-785H (Newark, New Jersey, USA) acoplado a um microscópio BAC151, com fonte de laser de 785 nm, resolução espectral de 3,5 cm⁻¹, tempo de aquisição de 30 segundos, potência de laser de 31,6 mW e lente objetiva de 20x.

A umidade dos excipientes foi medida utilizando um analisador de umidade da Shimadzu MOC63u (Toquio, Japão). Todas as análises foram realizadas utilizando aproximadamente 1,0 g de amostra e foram deixadas a uma temperatura de 120°C por uma hora.

5.2.4. Monitoramento da EZT-An pura por espectroscopia Raman e MCR-ALS.

A hidratação da ezetimiba anidra (EZT-An) foi feita de duas maneiras: no princípio ativo puro em condições ambiente (temperatura de 23°C e umidade relativa de 75%) e em um comprimido embalado à vacuo na presença de excipientes.

Para monitorar a transição da EZT-An pura, uma pequena quantidade de EZT-An foi colocada em uma placa de Petri nas condições ambientes e então foram coletados espectros a cada minuto durante 50 minutos. Os espectros adquiridos foram organizados em uma matriz de 50 linhas (espectros) por 991 colunas (Raman shift) correspondentes aos deslocamentos Raman de 204-1774 cm⁻¹. Foi utilizada correção da linha de base e normalização do espectro pela área, onde o espectro é dividido pela área total do espectro (dado pela soma do espalhamento de todas as variáveis). A ferramenta quimiométrica MCR-

Capítulo 5- Monitoramento da formação do monohidrato de Ezetimiba, promovido pela umidade dos excipientes, por meio de espectroscopia Raman e ferramentas quimiométricas.

ALS foi utilizada para deconvoluir os sinais sobrepostos das diferentes formas cristalinas. Para tanto foi utilizada a rotina ALS presente no pacote MCR-ALS toolbox¹⁰⁵. Para determinar o número de variáveis latentes necessárias para o modelo foi utilizada a rotina SVD do Matlab[®]. O MCR-ALS foi utilizado com duas componentes e a não-negatividade na concentração como única restrição ao modelo.

5.2.5. Monitoramento da hidratação da EZT-An promovida pela umidade dos excipientes por meio de espectroscopia Raman e PLS.

Com o objetivo de avaliar se a umidade dos excipientes poderia promover uma transição cristalina do princípio ativo, um comprimido “teste” contendo os excipientes e EZT-An foi preparado e embalado à vácuo. A porcentagem de cada excipiente usada para produzir o comprimido “teste” e “padrão” está na Tabela 5- 1. A formulação empregada é dada na primeira coluna da Tabela 5- 1, adicionando 10 mg de EZT-An para o comprimido “teste”. Para preparar os comprimidos feitos em laboratório foi consultado uma bula do fármaco Zetia[®] para saber os excipientes utilizados na formulação. Como as proporções dos excipientes não são descritas na bula, estimou-se a concentração dos mesmos consultando o Handbook de excipientes⁹⁴. O objetivo não era produzir comprimidos com a mesma composição de excipientes do Zetia[®], mas verificar se esses excipientes podem promover uma transição cristalina da ezetimiba por transferência da água presente nos excipientes. Os espectros Raman dos comprimidos foram coletados em tempo diferentes, através da embalagem, em 0, 2, 6, 12 e 24 horas depois da preparação do comprimido “teste”. A quantidade de EZT-An e EZT-H foi quantificada usando um modelo de calibração multivariada construído com diferentes proporções de EZT-H e EZT-An na presença dos excipientes (comprimidos padrão). Como o objetivo era construir um modelo para quantificar as formas cristalinas do princípio ativo, a composição dos excipientes foi constante em todos os comprimidos de calibração e validação.

Cada comprimido “padrão” pesa aproximadamente 100 mg, sendo 90 mg de excipientes (composição constante) e 10 mg de princípio ativo. Os 10 mg do API eram constituídos de uma mistura binária de EZT-An e EZT-H, com intervalos de 1 mg para cada componente, partindo 0 mg até 10 mg. Esses 11 comprimidos formaram o conjunto de calibração. Para o conjunto de validação foram preparadas 7 amostras onde a quantidade de cada componente variou de 1,5 a 8,5 mg para cada forma do princípio ativo, também como uma mistura binária e composição constante dos excipientes. Por causa da rápida hidratação da EZT-An, observada em testes anteriores, a preparação das amostras de calibração

Capítulo 5- Monitoramento da formação do monohidrato de Ezetimiba, promovido pela umidade dos excipientes, por meio de espectroscopia Raman e ferramentas quimiométricas.

(comprimidos padrão) precisou de um procedimento especial: para cada amostra, os excipientes e a EZT-An foram deixados no dessecador por quatro semanas, depois desse período a EZT-H foi adicionada à amostra e então misturada com auxílio de um almofariz e pistilo, onde suavemente misturada. Em seguida levou-se a mistura para um pastilhador onde os comprimidos foram produzidos, utilizando uma pressão de 100 kg/cm², seguida pela análise por espectroscopia Raman. Foram adquiridas 10 replicatas de espectros Raman por amostra, para evitar o problema de micro heterogeneidade.

Tabela 5- 1: Proporção na formulação (% massa/massa)^a, umidade (% massa/massa)^b e contribuição no conteúdo de água no comprimido (mg) de cada excipiente nos comprimidos feitos em laboratório^c.

Excipiente	Proporção ^a	umidade ^b	Contribuição no conteúdo de água ^c
Croscarmelose	4,5	13,83	0,7
Lactose monohidrata	4,5	4,69	0,2
Estearato de Magnésio	18	4,01	0,8
Celulose	60	6,98	4,7
Povidona	2	9,85	0,2
Laurilsulfato de Sódio	1	2,31	0,0
EZT-An	10	0	0

O modelo de regressão multivariada foi construído utilizando PLS do pacote estatístico PLS_toolbox 6.2 (Eigenvector Research Inc., Wenatchee, WA, USA), disponível para Matlab[®] 2011a (Mathworks Inc., Natick, MA, USA). Foram realizadas 10 replicatas de espectros para cada uma das 11 amostras. As replicatas tiveram a linha base corrigida e foram normalizadas pela área, seguido pela realização da média para obtenção de um único espectro, representativo da amostra. O modelo PLS foi construído utilizando os 11 espectros representativos dos comprimidos padrão, utilizando primeira derivada e normalização pela área.

Capítulo 5- Monitoramento da formação do monohidrato de Ezetimiba, promovido pela umidade dos excipientes, por meio de espectroscopia Raman e ferramentas quimiométricas.

5.3. Resultados e discussão.

5.3.1. Caracterização da ezetimiba.

As estruturas das formas cristalinas puras da EZT-H e EZT-An foram confirmadas por DRX (Figura 5. 1). É possível observar picos seletivos para EZT-An em 8,2; 10,0; 16,4 e 17,9 $2^\circ\theta$ que confirma a diferença entre as estruturas que apresentam padrão de difração único nos picos em 7,8; 12,0 and 15,7 $2^\circ\theta$.

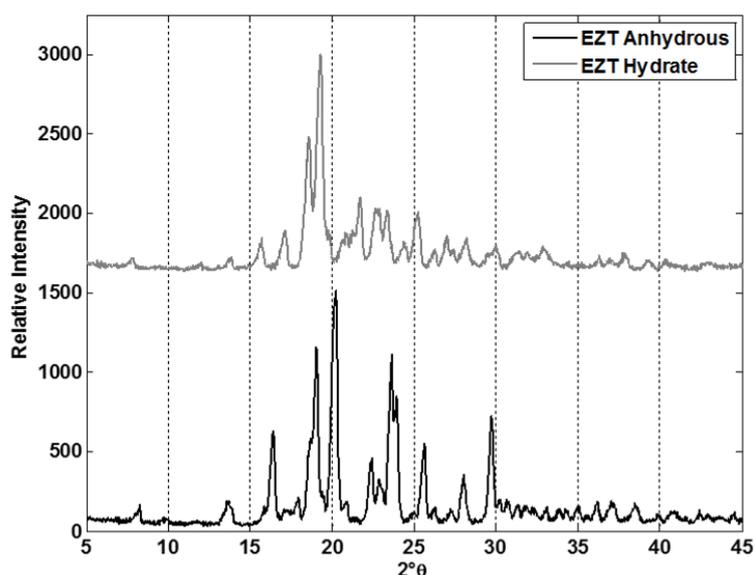


Figura 5. 1: Difratogramas das duas estruturas cristalinas de ezetimiba. Em cinza EZT-H e em negro EZT-An.

Para reforçar a caracterização foram coletados espectros Raman das duas formas puras com o objetivo de observar as diferenças nos padrões de vibração das duas estruturas. A Figura 5. 2 mostra os espectros Raman das duas estruturas de ezetimiba, EZT-H e EZT-An. As mudanças mais significativas entre as duas formas estão nos seguintes deslocamentos Raman: próximo a 1700 cm^{-1} , entre $800\text{-}850\text{ cm}^{-1}$ e o pico duplo em 621 cm^{-1} . Em 1700 cm^{-1} há deslocamento do pico relativo ao estiramento de C=O. No espectro da forma hidratada o pico em 1713 cm^{-1} se desloca para 1723 cm^{-1} na forma anidra. Na região dos aromáticos, de $800\text{-}850\text{ cm}^{-1}$ existem diferentes picos. Na forma hidratada é possível observar um pico duplo entre 822 e 838 cm^{-1} e um pico único em 860 cm^{-1} , enquanto que na forma anidra há um pico triplo em 832 , 825 and 815 cm^{-1} e um pico único em 852 cm^{-1} . Em 621 cm^{-1} é possível observar um pico duplo no espectro de EZT-An, diferentemente do espectro de EZT-H que apresenta um pico único, relativo a torção no plano para O-H do fenol¹⁰⁶.

Capítulo 5- Monitoramento da formação do monohidrato de Ezetimiba, promovido pela umidade dos excipientes, por meio de espectroscopia Raman e ferramentas quimiométricas.

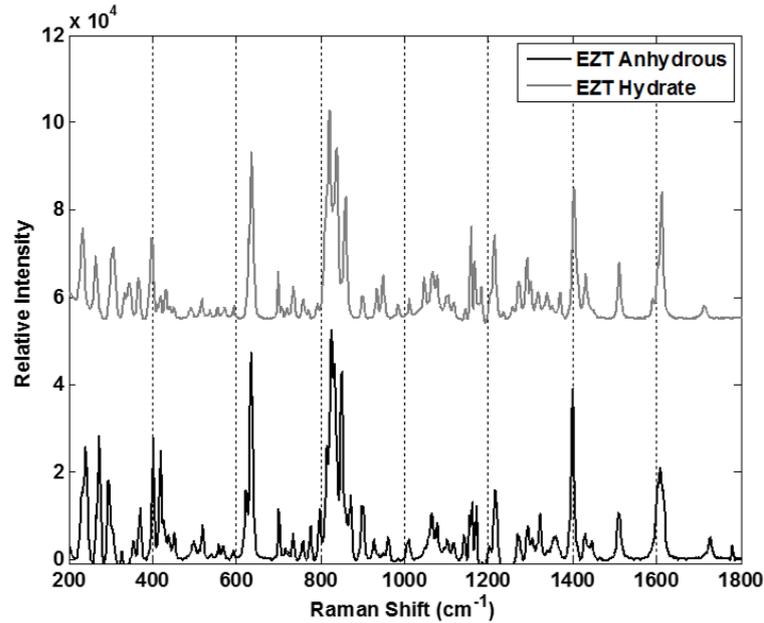


Figura 5. 2: Espectros Raman das formas EZT-H (hidrato) e EZT-An (anidra).

As razões para as mudanças no espectro Raman para ambas estruturas é melhor compreendida quando as estruturas absolutas das mesmas são comparadas^{46,101}. Na Figura 5. 3 vê-se as estruturas cristalinas de ambas estruturas (EZT-An e EZT-H) obtidas por difração de Raio-X de monocristal. Como pode ser visto, não há muita diferença entre as estruturas, porém as ligações de hidrogênio são diferentes. Na EZT-An as ligações de hidrogênio do que estabilizam a estrutura estão presentes entre O1 - O2 e entre O1 - O3.

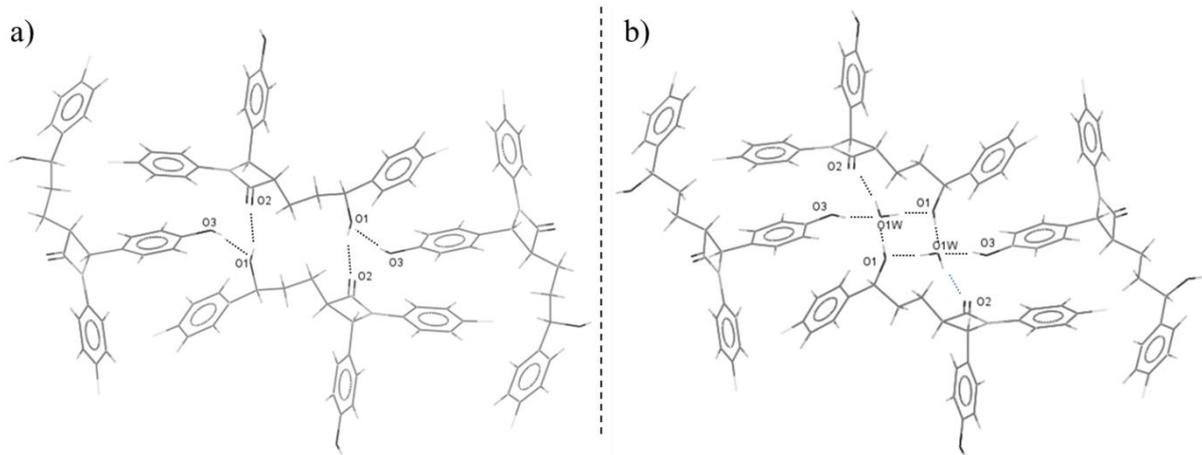


Figura 5. 3: Estruturas cristalinas da ezetimiba. Em a) EZT-An e em b) EZT-H.

Na EZT-H não há ligações de hidrogênio entre as moléculas de ezetimiba, mas as moléculas de água estão conectando as moléculas de ezetimiba por fortes ligações de hidrogênio entre O1W - O1 e O1W - O3, como descrito na Tabela 5- 2. Essas pequenas

Capítulo 5- Monitoramento da formação do monohidrato de Ezetimiba, promovido pela umidade dos excipientes, por meio de espectroscopia Raman e ferramentas quimiométricas.

diferenças existentes nas ligações causam alterações nas energias vibracionais das ligações, levando às diferenças notadas nos espalhamentos Raman.

Tabela 5- 2:Distância entre os oxigênios (Å) nas estruturas cristalinas de EZT-An e EZT-H.

ligações	Forma	Forma
	anidra	hidratada
O1 -- H -- O2	2,743*	4,581
O1 -- H -- O3	2,775*	4,780
O2 -- H -- O3	3,306	3,359
O1 -- H -- O1W	--	2,708*
O2 -- H -- O1W	--	2,698*
O3 -- H -- O1W	--	2,801*

Com objetivo de confirmar a presença de água na estrutura da ezetimiba (EZT-H), foi realizada uma análise termogravimétrica (Figura 5. 4). É possível verificar uma perda de massa de 4,3% entre 45°C e 90°C para EZT-H enquanto que na EZT-An não se observa nenhuma perda. Pela perda de massa observada durante a análise da EZT-H é possível estimar o número de moléculas de água correspondente a essa massa e então encontrar a proporção entre moléculas de água e EZT. A proporção encontrada entre moléculas de EZT e água foi de 1:1 sendo então a molécula monohidratada. A massa molecular da ezetimiba monohidratada é de $427,4\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$, onde as moléculas de água representam 4,21% de sua massa.

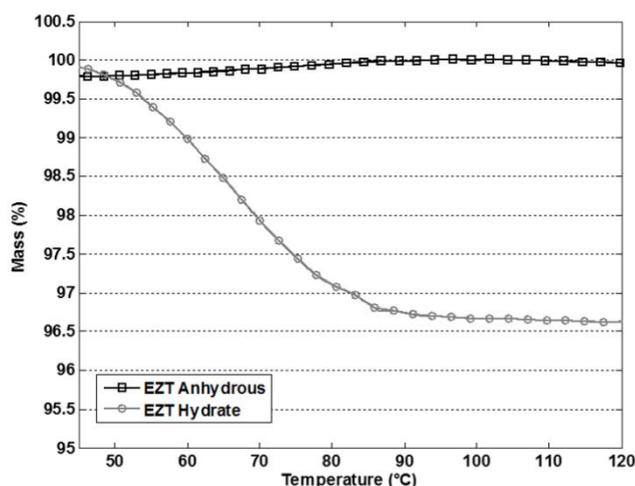


Figura 5. 4: Análise termogravimétrica para EZT-H (cinza) e EZT-An (negro).

Capítulo 5- Monitoramento da formação do monohidrato de Ezetimiba, promovido pela umidade dos excipientes, por meio de espectroscopia Raman e ferramentas quimiométricas.

5.3.2. Monitoramento da hidratação da EZT-An por espectroscopia Raman e MCR-ALS.

A hidratação da ezetimiba foi realizada utilizando a forma pura da ezetimiba anidra, a qual foi exposta à umidade relativa de 75% e temperatura de 23°C. Esse processo foi monitorado de forma *in line* por espectroscopia Raman durante 50 minutos. A Figura 5. 5 mostra os perfis de concentração e espectral recuperados pelo MCR-ALS para o princípio ativo. O perfil de concentração (Figura 5. 5a) mostra que no início do monitoramento apenas a forma anidra está presente, cerca de 10 minutos depois quase metade da forma anidra já foi convertida para a forma monohidratada e após 30 minutos de monitoramento quase não há mais a forma anidra, sendo o espectro recuperado muito similar ao espectro da forma EZT-H.

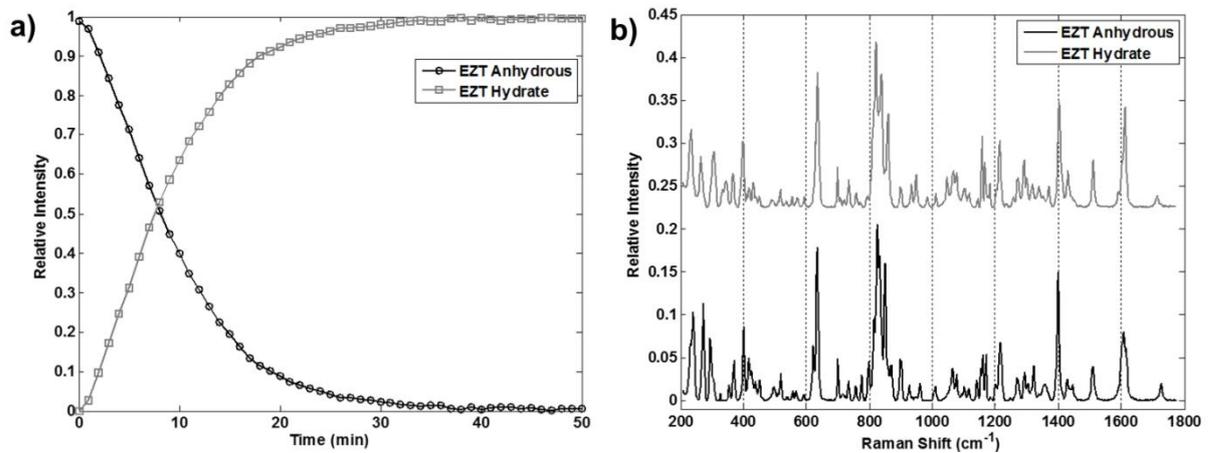


Figura 5. 5: a) Concentração relativa e b) espectros recuperados por MCR-ALS para EZT-An (cinza) e EZT-H (negro) durante a transição de fase do princípio ativo puro.

Os perfis espectrais recuperados por MCR-ALS (Figura 5. 5b) mostraram boa concordância com os respectivos espectros das formas puras de EZT-H e EZT-An. O modelo de MCR-ALS apresentou bom ajuste aos dados experimentais com falta de ajuste de 3,58% e variância explicada de 99,87% (R^2 de 0,9987). Esses resultados demonstram que a ezetimiba apresenta rápida transição entre as formas anidra e hidratada, requerendo um controle rigoroso na manipulação do princípio ativo.

Capítulo 5- Monitoramento da formação do monohidrato de Ezetimiba, promovido pela umidade dos excipientes, por meio de espectroscopia Raman e ferramentas quimiométricas.

5.3.3. monitoramento da hidratação da EZT-An, via espectroscopia Raman e PLS, promovida pela umidade dos excipientes.

Uma vez que existe a possibilidade de que a umidade dos excipientes cause a hidratação da EZT-An por meio da migração das moléculas de água no meio, foi desenvolvido um experimento para compreender a possível hidratação *in situ*. Para tanto, foi avaliada a quantidade de água presente em cada excipiente usado na formulação do comprimido e então foi feito um comprimido “teste” contendo apenas os excipientes e EZT-An e este foi embalado à vácuo imediatamente após a compressão. As proporções são descritas na Tabela 5- 1, assim como a umidade presente em cada excipiente e sua contribuição para a quantidade total de água presente no comprimido “teste”. É possível observar que o excipiente que apresentou maior quantidade de água foi a croscamelose sódica, contudo a celulose contribuiu com a maior parte da água presente no comprimido. A quantidade total de água presente no comprimido foi 6,6 mg, levando em consideração que o comprimido apresenta 10 mg de EZT-An, conclui-se que a quantidade de água presente no comprimido é mais que suficiente para a hidratação da EZT-An.

A Figura 5. 6 apresenta os espectros Raman do monitoramento do comprimido “teste”. Depois de 24 horas foi possível observar uma alta taxa de conversão da forma EZT-An para a forma EZT-H, observado nas mudanças espectrais ocorridas em alguns picos como: no pico duplo em 621 cm^{-1} , ocorreu um decréscimo de sua intensidade e no pico único da região dos aromáticos em 852 cm^{-1} .

Para a quantificação das duas espécies de ezetimiba no comprimido “teste” monitorado, foi utilizado um modelo de calibração usando espectroscopia Raman, como descrito na seção 5.2.5.

Foi construído um modelo PLS usando duas variáveis latentes já que havia somente duas fontes de variação do sinal químico obtido por espectroscopia Raman, que eram as duas formas cristalinas de ezetimiba (a composição dos excipientes é constante).

Capítulo 5- Monitoramento da formação do monohidrato de Ezetimiba, promovido pela umidade dos excipientes, por meio de espectroscopia Raman e ferramentas quimiométricas.

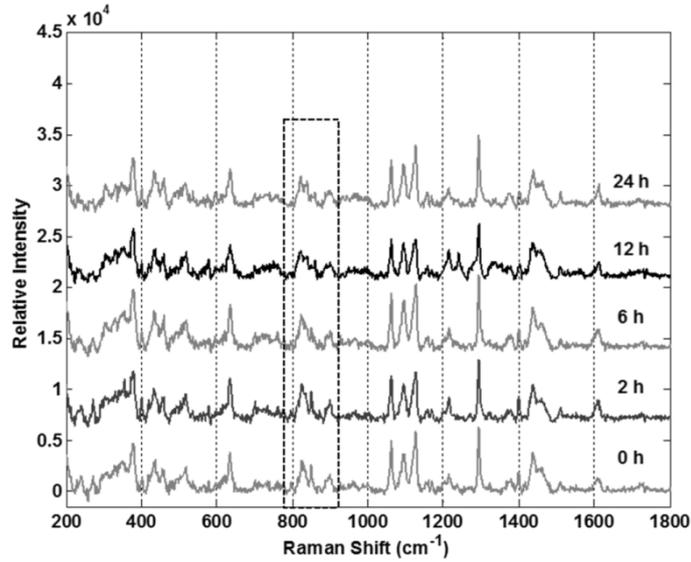


Figura 5. 6: Espectros do comprimido teste retirados nos tempos 0h, 2h, 6h, 12h e 24h, depois de seu preparo.

A Figura 5. 7 apresenta os valores da raiz quadrada do erro da validação cruzada (RMSECV, leave one out)⁹⁸ versus o número de variáveis latentes, por essa figura é possível observar que apenas duas variáveis latentes são suficientes para o modelo, já explicando a maior parte dos dados. Essa metodologia evita uma escolha excessiva de variáveis latentes, que pode superestimar o modelo⁶⁶. A variância explicada para os dados da matriz X (espectros) e da matriz Y (valores de concentrações das formas cristalinas) no modelo PLS, utilizando duas variáveis latentes, foi de 99,12%, para o bloco Y e 97,22% para o bloco X.

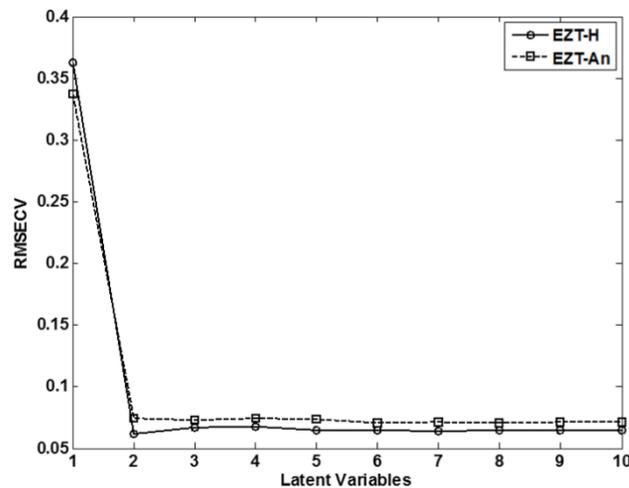


Figura 5. 7: Variáveis latentes vs erro de validação cruzada (RMSECV).

Capítulo 5- Monitoramento da formação do monohidrato de Ezetimiba, promovido pela umidade dos excipientes, por meio de espectroscopia Raman e ferramentas quimiométricas.

Depois de construir o modelo de calibração, um conjunto de validação foi preparado com o objetivo de testar a robustez do modelo adquirido, o conjunto de validação contém sete amostras. Esse teste é importante pois avalia se os parâmetros obtidos com o modelo construído são reprodutíveis, o que confirma a capacidade do modelo em realizar novas previsões. Se o modelo for robusto o conjunto de validação apresentará erros similares de RMSECV, RMSEP e RMSEC (respectivamente erro de raiz quadrada do: erro de validação cruzada, do erro de validação e do erro de calibração). A Tabela 5- 3 apresenta um resumo dos parâmetros estatísticos para analisar a qualidade do modelo PLS.

Tabela 5- 3: Parâmetros do modelo PLS para EZT-H e EZT-An (erros dado em % massa/massa).

Parâmetros	EZT-H	EZT-An
RMSEC	0,5 ^a (4,9 ^b)	0,6 ^a (6,2 ^b)
RMSECV	0,6 ^a (6,3 ^b)	0,8 ^a (7,6 ^b)
RMSEP	0,7 ^a (6,8 ^b)	0,6 ^a (5,8 ^b)
R ² Cal ^c	0,976	0,962
R ² CV ^c	0,963	0,943
R ² Val ^c	0,970	0,966

^a valores de erros considerando a massa de uma forma cristalina comparada a massa total do comprimido (100mg); ^b Valores entre parênteses consideram a massa de uma forma cristalina do princípio ativo frente a massa total de princípio ativo (10 mg); ^c os coeficientes de determinação mostram a correlação entre os valores reais e os valores preditos.

Os valores de RMSEC, RMSECV e RMSEP apresentam boa concordância tanto para EZT-H quanto para EZT-An. Considerando a massa total do comprimido os erros são da ordem de 0,6%, isso significa que em um comprimido de 100 mg com 10 mg de ezetimiba é possível quantificar as formas cristalinas do princípio ativo, mesmo na presença de excipientes, com um erro padrão de 0,6 mg. Devido ao erro encontrado na análise, a técnica poderia ser utilizada para controle de qualidade do produto final, relativo à quantificação das formas cristalinas do princípio ativo. A Figura 5. 8 mostra a correlação entre os valores preditos pelo modelo e os valores reais, os valores são dados em fração (% massa/massa) da forma cristalina de interesse em cada comprimido.

Capítulo 5- Monitoramento da formação do monohidrato de Ezetimiba, promovido pela umidade dos excipientes, por meio de espectroscopia Raman e ferramentas quimiométricas.

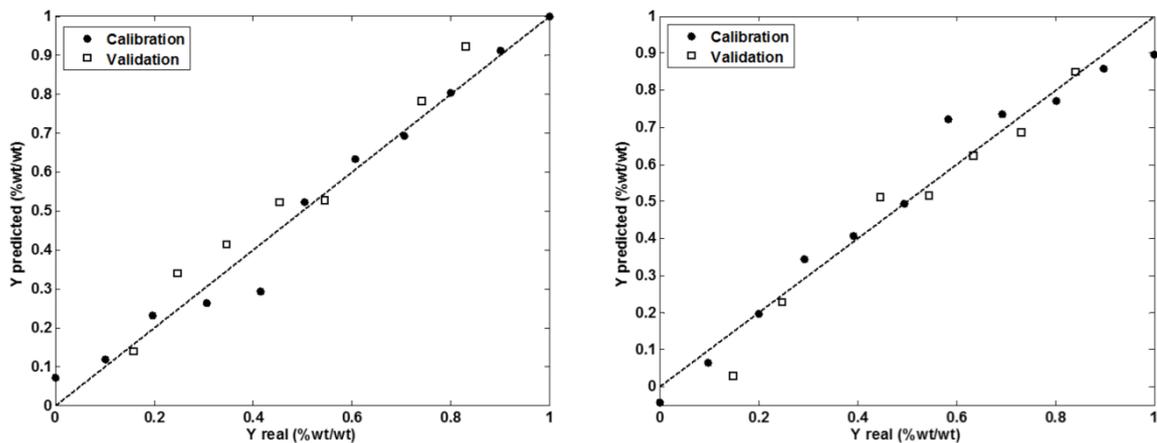


Figura 5. 8:Valores reais vs valores preditos pelo modelo PLS. Amostras de calibração (pontos) e validação (quadrados).

Os espectros adquiridos durante o monitoramento do comprimido “teste” foram analisados pelo modelo de regressão de PLS. Os resultados mostraram que nos tempos 0, 2, 6, 12 e 24 horas a conversão da EZT-An para EZT-H foi 32,8; 38,4; 49,0; 60,8 e 71,9%, respectivamente. Vale salientar que o tempo 0h, começo do monitoramento, é diferente do tempo que o comprimido foi feito e embalado. Por essa razão uma pequena porção de EZT-An já havia se hidratado no tempo 0h do monitoramento.

5.4. Conclusão.

Nesse trabalho foi possível mostrar que a associação de espectroscopia Raman a ferramentas quimiométricas pode resolver um dos principais problemas da indústria farmacêutica que é a determinação e quantificação de diferentes formas cristalinas do princípio ativo, tanto na linha de produção como no produto final. A ezetimiba demonstrou ser uma molécula com potencial para sofrer mudanças de seu hábito cristalino no produto final, uma vez que se hidrata rapidamente. Determinou-se que o princípio ativo puro e na forma anidra se hidrata completamente em aproximadamente 30 minutos em atmosfera com umidade relativa de 75% e temperatura de 23°C. Também foi verificado que a umidade presente nos excipientes pode promover uma transição das fases cristalinas no princípio ativo. Os valores de erro de calibração do modelo foi de 0,6%, mostrando que a espectroscopia Raman associada ao PLS é uma excelente abordagem para quantificação de formas cristalinas em comprimidos. Os resultados adquiridos nesse trabalho também mostram a importância de

Capítulo 5- Monitoramento da formação do monohidrato de Ezetimiba, promovido pela umidade dos excipientes, por meio de espectroscopia Raman e ferramentas quimiométricas.

um rigoroso controle de qualidade para manipulação e produção de fármacos de ezetimiba comercializados.

**Capítulo 6- Determinação de três
polimorfos de clopidogrel por meio de
espectroscopia Raman e no
infravermelho aliada à calibração
multivariada**

6. Determinação de três polimorfos de clopidogrel por meio de espectroscopia Raman e no infravermelho aliada à calibração multivariada.

6.1. Introdução e objetivos.

Bisulfato de Clopidogrel (CBS) é um dos princípios ativos que apresenta transições polimórficas, é utilizado como inibidor da agregação de plaquetas e é vendido como um agente anti-anginal e utilizado para controlar problemas cardiovasculares e acidentes vasculares cerebrais⁵¹. A molécula de CBS apresenta alguns grupos funcionais polares, como se pode ver na Figura 1. 13 (introdução).

Os polimorfos I e II de CBS são comercializados em formulações farmacêuticas^{53,107}. As companhias farmacêuticas engajadas na elaboração de produtos genéricos necessitam utilizar polimorfos diferentes dos polimorfos I e II em suas formulações e a fase amorfa se torna um dos possíveis polimorfos devido às propriedades anteriormente citadas. Uma que se venha utilizar a fase amorfa nessas formulações existe a possibilidade da conversão para as formas I e II, tanto na linha de produção como no produto final, sendo necessário um método de análise para controle de qualidade.

O objetivo desse trabalho foi avaliar os dois métodos espectroscópicos, Raman e IR, para quantificar misturas dos polimorfos I, II e amorfo de CBS.

6.2. Materiais e métodos.

Inicialmente o polimorfo II e o amorfo foram sintetizados a partir do polimorfo I, gentilmente cedido por uma companhia farmacêutica local.

6.2.1. Síntese do CBS amorfo.

Para preparar o CBS amorfo, 1 g de CBS I foi pesado e solubilizado em metanol (10 mL) grau analítico (Chemis). A solução obtida foi evaporada até a formação de uma material com o aspecto de uma resina amarelada. A mesma foi transferida para um Erlenmeyer conectado à uma bomba de vácuo. Em seguida a resina obtida foi submetida à pressão de 660 mmHg por três horas, até que se transformasse em um sólido com aspecto de espuma, e então estocou-se o produto obtido em um dessecador. A estrutura do material foi confirmada por DRX.

6.2.2. Síntese de CBS II.

Para preparar o CBS II, 1 g de CBS I foi pesado e adicionado a 27 mL de acetato de Etila e aquecido até 40°C por 36 horas. Em seguida a mistura foi filtrada e estocada em um dessecador.

6.2.3. Preparação das misturas polimórficas e amostras.

Para minimizar o número de experimentos necessários para um conjunto de calibração utilizou-se um planejamento experimental de mistura ternária. Um grupo de 10 amostras foram preparadas para construir um modelo de calibração e outras 5 amostras foram preparadas para validar o modelo. A Tabela 6-1 mostra as quantidades de polimorfos de CBS em cada amostra.

Cada amostra foi constituída aproximadamente por 50 mg. Para coletar espectros com a melhor qualidade possível as amostras foram prensadas manualmente com o auxílio de um pastilhador para amostras de IR. Esse processo torna o espectro mais intenso porque agrega uma maior quantidade de cristais por área analisada.

Após a preparação das amostras para IR e Raman os espectros foram coletados, totalizando 10 espectros por amostra.

6.2.4. Instrumentação utilizada.

Os três polimorfos de CBS foram caracterizados por espectroscopia Raman, Infravermelho médio com dispositivo de reflectância atenuada e DRX. O difratômetro de raio-x foi um Rigaku Dmax 2500PC (Tóquio, Japão) com fonte de Cobre (comprimento de onda de 0,154 nm) com voltagem de 40 kV e corrente de emissão de 40 mA. As amostras foram analisadas na faixa de 5° até 45° (2θ) com velocidade de varredura de 0,2° min⁻¹.

Para as análises com espectroscopia Raman utilizou-se um aparelho B&W Tek i-Raman modelo BWS 415-785H (Newark, New Jersey, USA) acoplado a um microscópio BAC151, laser de 785 nm, resolução espectral de 3,5 cm⁻¹, tempo de aquisição de 15 segundos, potência de laser de 94,8 mW e lente objetiva de 40x.

Capítulo 6- Determinação de três polimorfos de clopidogrel por meio de espectroscopia Raman e no infravermelho aliada à calibração multivariada

Tabela6- 1: Massa em miligramas. dos polimorfos de CBS contidos nos conjuntos de calibração e validação. Em parênteses a porcentagem em massa de cada polimorfo na amostra.

	Polimorfos			
	amostras	CBS I	CBS II	CBS amorfa
Conjunto de calibração	1	0	0	50
	2	0	50	0
	3	50	0	0
	4	26,2 (49,6%)	26,6 (50,4%)	0
	5	26,3 (45,7%)	0	26,6 (50,3%)
	6	0	26,5 (51%)	25,4 (49%)
	7	33,4 (66,1%)	08,5 (16,8%)	08,7 (17,1%)
	8	08,9 (17,5%)	33,4 (65,6%)	08,6 (16,9%)
	9	08,7 (17,4%)	08,5 (17%)	32,8 (65,6%)
	10	17 (32,9%)	17,4 (33,7%)	17,2 (33,4%)
Conjunto de validação	11	10,8 (21%)	10,3 (20%)	30,3 (59%)
	12	10,3(20,3%)	30,7 (60,4%)	09,8 (19,3%)
	13	30,0 (59%)	10,4 (20,5%)	10,4 (20,5%)
	14	40,6 (79%)	05,4 (10,5%)	05,4 (10,5%)
	15	15,7 (30,8%)	15,0 (29,4%)	20,3 (39,8%)

Para as análises em espectroscopia no infravermelho média utilizou-se um equipamento Varian 660 FT-IR com um acessório de reflectância total atenuada (ATR). O equipamento foi ajustado para fazer 64 varreduras por espectro.

6.2.5. Análise multivariada.

As análises multivariadas foram realizadas utilizando um modelo de regressão por iPLS usando o programa Matlab® 2011a, com PLS toolbox 6.2.

6.3. Resultados e discussão.

A molécula de Clopidogrel contém alguns grupos funcionais polares que favorecem o uso de espectroscopia infravermelha e também é uma molécula com grande nuvem eletrônica, que pode favorecer o uso de espectroscopia Raman. Logo é possível realizar uma comparação para os resultados com a aplicação de ambas as técnicas.

Inicialmente as formas polimórficas de Clopidogrel foram confirmadas por DRX. A Figura 6. 1 contém os difratogramas dos três componentes obtidos. A fase amorfa, difratograma ao fundo da figura, não apresenta picos. O difratograma contido no meio da figura é referente ao polimorfo CBS II e o difratograma na parte de cima da figura é referente ao polimorfo CBS I. É possível notar que há diferença nos difratogramas referentes ao CBS I e CBS II, pois há padrão distinto de picos para os dois polimorfos. Ambos difratogramas foram comparados com os dados descritos na literatura⁵¹ confirmando a estrutura dos polimorfos I e II de CBS. Em seguida preparou-se 10 amostras (planejamento experimental ternário) para construir um modelo de calibração e mais 5 amostras de validação para o modelo.

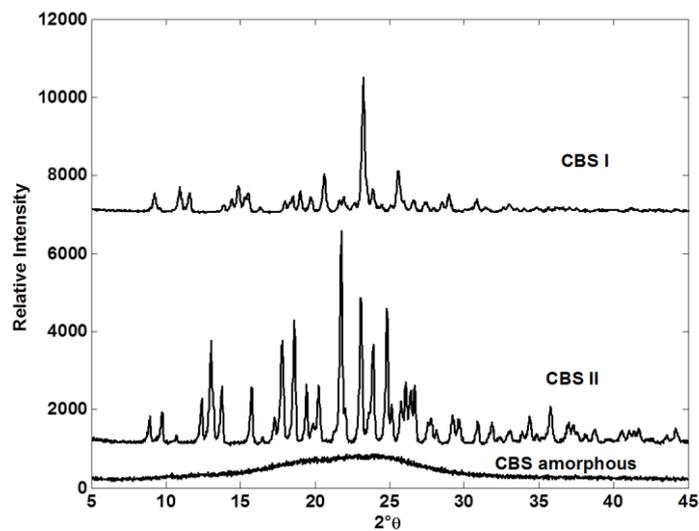


Figura 6. 1: Difratogramas das três formas de Clopidogrel.

O preparo das amostras foi realizado da mesma maneira que nos trabalhos anteriores envolvendo a mistura de polimorfos. Após a mistura dos componentes, eles foram homogeneizados e comprimidos manualmente, evitando a transformação dos polimorfos. Contudo, o aspecto físico de cada polimorfo é bastante complexo isso porque o tamanho das partículas para os polimorfos de Clopidogrel são muito diferentes entre si, além de haver a

fase amorfa que apresenta problemas de estabilidade física. Logo foi relativamente difícil obter uma boa homogeneidade, o que aumentou os valores de erro encontrado nas medidas. Além disso, a resposta de sinal obtida para o amorfo é menos intenso quando comparado com os outros polimorfos.

Nas análises por espectroscopia Raman coletaram-se 10 espectros por amostra e realizou-se uma média entre esses espectros afim de minimizar os problemas de micro heterogeneidade. O pré-tratamento utilizado foi: normalizar o espectro pela área, suavizar os espectros (Savitsky Golay, 15 pontos), e primeira derivada (ordem 2, 15 pontos). Em seguida realizou-se uma regressão por intervalos, com 35 variáveis por intervalo. Os intervalos utilizados se encontram abaixo da Tabela 6- 2. O modelo calculado necessitou de três variáveis latentes para acumular uma variância de 99,84% dos dados (Figura 6. 2), as variáveis latentes foram obtidas por validação cruzada do tipo leave one out.

Erro! Fonte de referência não encontrada.

Figura 6. 2: Variáveis latentes vs erro de validação cruzada (RMSECV), para o modelo de espectroscopia Raman.

A necessidade de três variáveis está de acordo com o número de polimorfos presentes no modelo, o que indica que todos os polimorfos contribuem como diferentes fontes de variação de sinal. As diferenças nos espectros Raman das amostras puras de cada polimorfo podem ser vistas na Figura 6. 4.

Pode-se observar que os valores são da mesma ordem dos valores obtidos em outros trabalhos⁸⁴, sendo o erro mais alto da ordem de 12%. Contudo o valor de ajuste linear (R^2) está abaixo dos valores usuais, entre 0,8 e 0,9, o que indica que os valores de resíduos são altos, ou seja, o valor real e o valor predito pelo modelo apresentam uma variação maior do que o comum. Uma explicação para o ocorrido pode estar em dois fatos observados nesse trabalho: a qualidade do sinal para a fase amorfa é menor em relação aos outros polimorfos, e a mistura dos polimorfos não é totalmente homogênea devido à variação no tamanho de partículas. As junções dessas características prejudicaram os valores encontrados no modelo. A Figura 6. 3 mostra a distribuição dos valores reais vs valores preditos pelo modelo.

Capítulo 6- Determinação de três polimorfos de clopidogrel por meio de espectroscopia Raman e no infravermelho aliada à calibração multivariada

Tabela6- 2: Parametros para o modelo iPLS para espectroscopia Raman, valores dado em % massa/massa.

Parametros	Polimorfos de Clopidogrel		
	CBS I	CBS II	CBS amorfo
RMSEC	8,6	6,0	8,5
RMSECV	12,4	9,5	12,1
RMSEP	6,3	10,0	12,3
R ²	0,91	0,85	0,76

Intervalos utilizados no modelo [208-355, 572-640, 845-909 ,1039-1162] cm⁻¹.

Capítulo 6- Determinação de três polimorfos de clopidogrel por meio de espectroscopia Raman e no infravermelho aliada à calibração multivariada

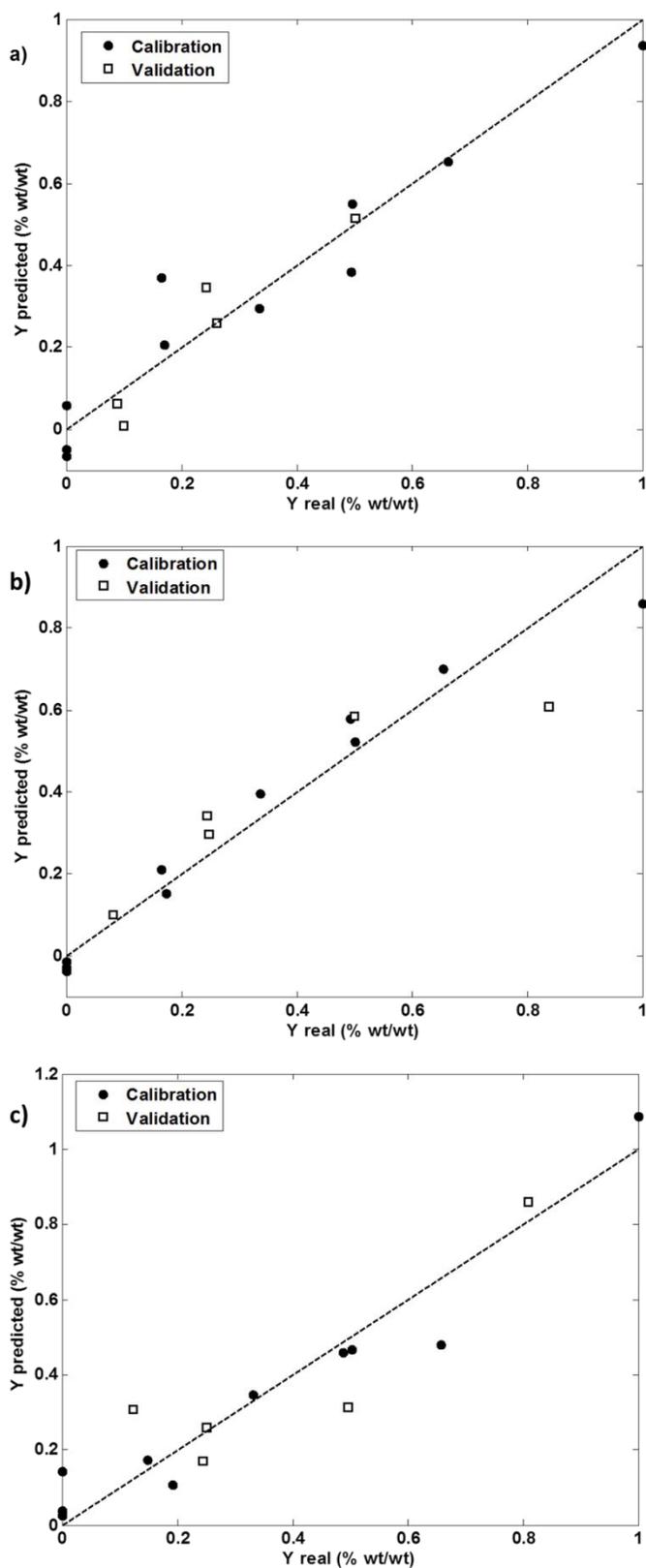


Figura 6. 3: diagrama de valores reais vs valores preditos para o modelo iPLS/Raman: a) CBS I, b) CBS II e c) CBS amorfo.

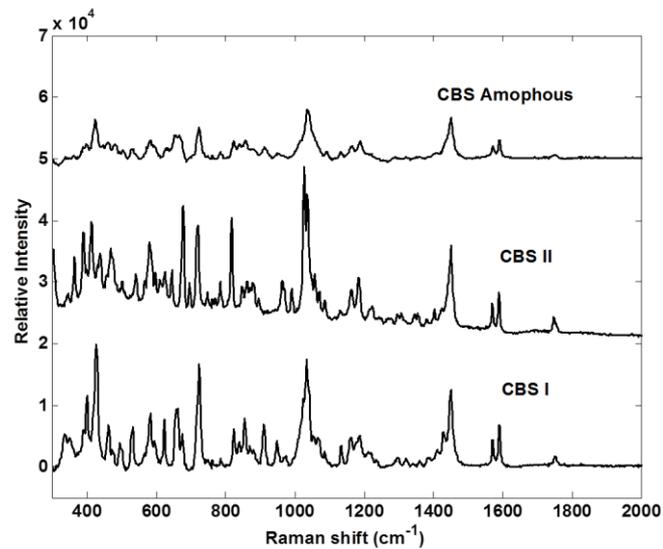


Figura 6. 4: Espectros Raman para as amostras puras dos polimorfos de clopidogrel.

O tempo gasto para a construção do modelo utilizando IR foi um pouco superior ao do Raman devido às características do suporte ATR. Devido ao fato de se colocar uma pequena porção da amostra de cada vez no cristal de ATR, a homogeneidade da mesma foi mais prejudicada em comparação às amostras para espectroscopia Raman. O lugar onde se deposita a porção da amostra, o cristal de ATR, é uma superfície pequena, portanto a amostragem pode vir a ser desigual, apesar de os espectros das amostras puras serem bons, como pode ser visto na Figura 6. 5.

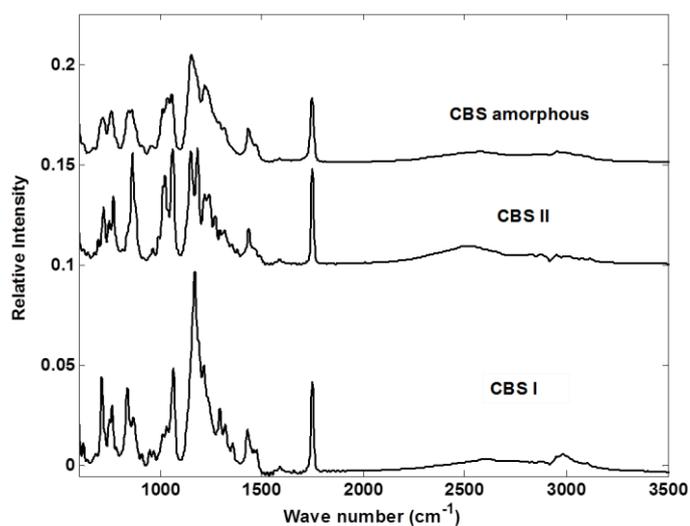


Figura 6. 5: Espectros de infravermelho médio para as amostras puras dos polimorfos de clopidogrel.

Apesar das diferenças entre os equipamentos os resultados para IR apresentam valores de R^2 melhores (Figura 6. 6) do que os resultados utilizando Raman, como pode ser visto na Tabela6- 3. No modelo iPLS realizado para o IR, utilizou-se o seguinte pré-tratamento: alisamento do espectro (10 pontos), primeira derivada (Savitsky Golay, 15 pontos), normalização pela área e média dos espectros. Para encontrar o número de variáveis latentes utilizou-se a validação cruzada do tipo *leave one out*. O modelo de iPLS foi construído com intervalo de 20 variáveis.

Como pode-se ver na Figura 6. 7o número de variáveis latentes para o modelo de infravermelho é 3, após 3 variáveis latentes os erros de validação cruzada aumentam muito. Ainda assim, ao se observar os valores na Tabela6- 3, vê-se que os valores são inferiores aos valores encontrados com a espectroscopia Raman, e os valores R^2 estão distantes de 1, indicando alto valor residual.

Tabela6- 3: Parametros para o modelo iPLS para espectroscopia infravermelho, valores dado em % massa/massa.

Parametros	Polimorfos de Clopidogrel		
	CBS I	CBS II	CBS amorfo
RMSEC	9,1	13,9	11,4
RMSECV	12,9	19,3	16,4
RMSEP	9,7	14,5	13,7
R^2	0,92	0,81	0,87

Intervalos utilizados na construção do modelo: [599-636, 906-944, 1410-1446 1603-1639] cm^{-1} .

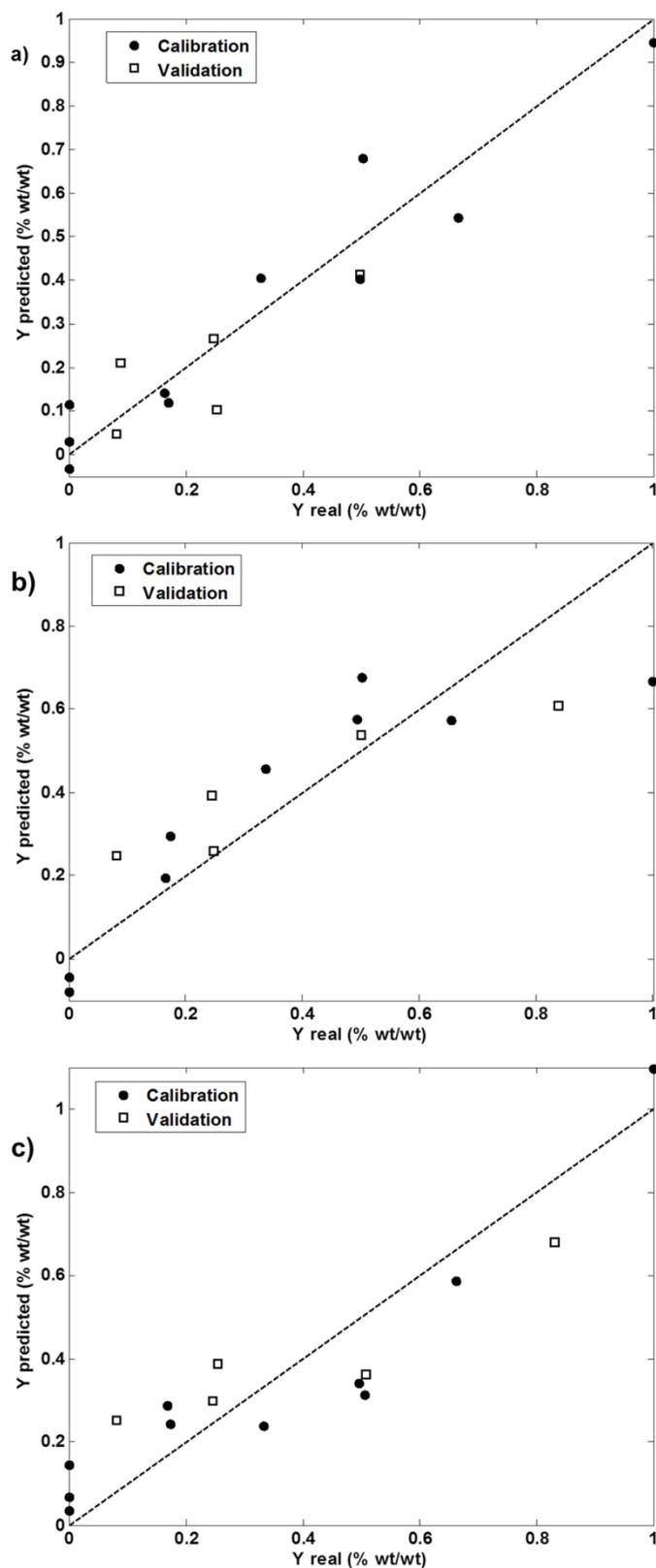


Figura 6. 6: diagrama de valores reais vs valores preditos para o modelo iPLS/MIR: a) CBS I, b) CBS II e c) CBS amorfo.

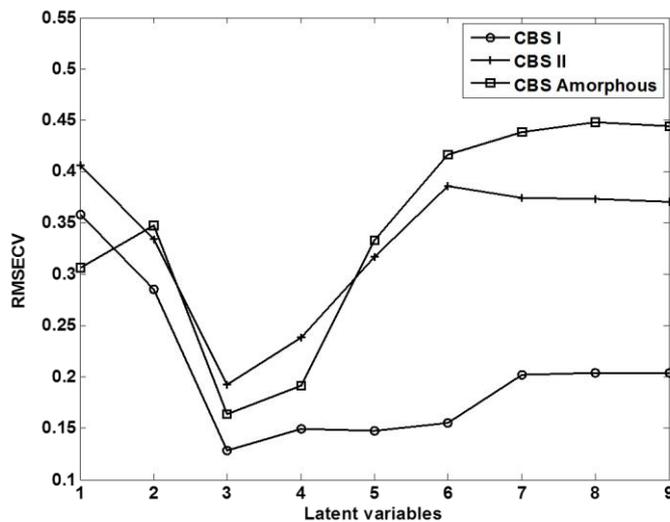


Figura 6. 7: Variáveis latentes vs erro de validação cruzada(RMSECV), para o modelo de espectroscopia Infravermelho.

6.4. Conclusão.

Nesse trabalho avaliou-se, dentre espectroscopia Raman e infravermelho, qual seria a melhor técnica para avaliar os polimorfos de Clopidogrel. Ambas as técnicas fornecem qualidade de sinal analítico menor na presença de um amorfo. Contudo, devido às peculiaridades do equipamento de infravermelho médio com cristal de ATR, conclui-se que a amostragem para essa técnica demonstrou-se mais trabalhosa. Porém os resultados entre IR e Raman são semelhantes, uma vez que os valores de erro de predição (RMSEP) são um pouco menores para espectroscopia Raman, porém apresentam um coeficiente de determinação (R^2) menor. Dessa forma, os valores de erro de predição para IR podem ser maiores, mas apresentam um resíduo menor. A utilização de técnicas quimiométricas demonstrou-se, mais uma vez, um recurso fundamental para o tratamento dos dados, permitindo a construção de um modelo de calibração.

A opção de se utilizar a fase amorfa do clopidogrel para a formulação dos fármacos é complexa devido às características físicas da mesma, formando uma espécie de resina que dificulta a manipulação na formulação.

**CAPÍTULO 7- PERSPECTIVAS
REFERENTES AOS
RESULTADOS ENCONTRADOS.**

7. Perspectivas referentes aos resultados encontrados.

De acordo com os resultados obtidos pode-se concluir que as técnicas espectroscópicas como infravermelho e Raman associadas às técnicas quimiométricas são uma opção real para análise quantitativa de polimorfos em produtos farmacêuticos comercializados, servindo como uma ferramenta para controle de qualidade. Ainda de acordo com os resultados obtidos é possível expandir a utilização dessa técnica para análise de cocristais em comprimidos, bem como o monitoramento da formação de cocristais à partir de seus precursores.

8. Referências bibliográficas.

1. COUNCIL, I.P.E., *The IPEC composition Guide*. 2009.
2. TAYLOR, L.S. & LANGKILDE, F.W., "Evaluation of solid-state forms present in tablets by Raman spectroscopy". *J. Pharm. Sci.* **89**(10): 1342, 2000.
3. BAUER, J.; SPANTON, S.; HENRY, R.; QUICK, J.; DZIKI, W.; PORTER, W. & MORRIS, J., "Ritonavir: an extraordinary example of conformational polymorphism". *Pharm. Res.* **18**(6): 859, 2001.
4. ADMINISTRATION, F.A.D., *ANDAs: Pharmaceutical Solid Polymorphism*, SERVICES, U.S.D.O.H.A.H., Editor. 2007.
5. HALEBLIAN, J. & MCCRONE, W., "Pharmaceutical applications of polymorphism". *J. Pharm. Sci.* **58**(8): 911, 1969.
6. BAUER, J.F., "Polymorphism—A Critical Consideration in Pharmaceutical Development, Manufacturing and Stability.". *Journal of Validation Technology*, (Pharmaceutical Solids): 7, 2008.
7. STAHLY, G.P., "Diversity in single- and multiple-component crystals. The search for and prevalence of polymorphs and cocrystals". *Cryst. Growth Des.* **7**(6): 1007, 2007.
8. MORISSETTE, S.L.; ALMARSSON, O.; PETERSON, M.L.; REMENAR, J.F.; READ, M.J.; LEMMO, A.V.; ELLIS, S.; CIMA, M.J. & GARDNER, C.R., "High-throughput crystallization: polymorphs, salts, co-crystals and solvates of pharmaceutical solids". *Adv Drug Deliv Rev.* **56**(3): 275, 2004.
9. BUCKTON, G. & DARCY, P., "Assessment of disorder in crystalline powders—a review of analytical techniques and their application". *International journal of pharmaceutics.* **179**(2): 141, 1999.
10. QUENTAL., C.; ABREU., J.C.D.; BONTEMPO., J.V. & GADELHA., C.A.G., "Medicamentos no Brasil: impactos das políticas públicas sobre a indústria nacional". *Ciência e Saúde Coletiva.* **13** 2008.
11. LIMA., D.M.M.D. & SILVEIRA., C.C.D.F.D., "O patenteamento de polimorfos na indústria farmacêutica e o acesso a medicamentos.". *Physis: Revista de Saúde Coletiva.* **21**(4) 2011.
12. ANVISA, *workshop validação de metodologia analítica – GGMed/ANVISA*. 2013.
13. BRITAIN, H.G., *Solid-state analysis*, in *Separation Science and Technology*, SATINDER, A. & STEPHEN, S., Editors. 2001, Academic Press: Milford, New Jersey. p. 57.

14. WENDLANDT, W.W., "Thermal analysis". *Analytical chemistry*. **58**(5): 1R, 1986.
15. BERNAL, C.; COUTO, A.B.; BREVIGLIERI, S.T. & CAVALHEIRO, É.T.G., "Influência de alguns parâmetros experimentais nos resultados de análises calorimétricas diferenciais - DSC". *Química Nova*. **25**: 849, 2002.
16. CHIENG, N.; RADES, T. & AALTONEN, J., "An overview of recent studies on the analysis of pharmaceutical polymorphs". *J. Pharmaceut. Biomed.* **55**(4): 618, 2011.
17. DE VILLIERS, M.M.; TERBLANCHE, R.J.; LIEBENBERG, W.; SWANEPOEL, E.; DEKKER, T.G. & SONG, M., "Variable-temperature X-ray powder diffraction analysis of the crystal transformation of the pharmaceutically preferred polymorph C of mebendazole". *J Pharm Biomed Anal.* **38**(3): 435, 2005.
18. MURNANE, D.; MARRIOTT, C. & MARTIN, G.P., "Polymorphic control of inhalation microparticles prepared by crystallization". *International journal of pharmaceuticals*. **361**(1-2): 141, 2008.
19. CHIENG, N.; ZUJOVIC, Z.; BOWMAKER, G.; RADES, T. & SAVILLE, D., "Effect of milling conditions on the solid-state conversion of ranitidine hydrochloride form 1". *International journal of pharmaceuticals*. **327**(1-2): 36, 2006.
20. SOARES, F.L.F., "Aplicação de espectroscopia raman e análise multivariada na caracterização e monitoramento in situ da síntese de cocristsais de carbamazepina-nicotinamida e ibuprofeno-nicotinamida"., in *Departamento de Química*. 2014, Universidade Federal de São Carlos.
21. HAMMOND, C., *The Basics of Crystallography and Diffraction*. 2 ed. 1997: Oxford University Press.
22. HARRIS, D.C., *Análise Química Quantitativa* 6ed. 2005: LTC.
- 23.homepage: <http://www.sbfisica.org.br/imagens/130-espectro-eletromagnetico>. 2012, acessada em 05/05/2015.
24. RINTOUL, L.; PANAYIOTOU, H.; KOKOT, S.; GEORGE, G.; CASH, G.; FROST, R.; BUI, T. & FREDERICKS, P., "Fourier transform infrared spectrometry: a versatile technique for real world samples". *Analyst*. **123**(4): 571, 1998.
25. MCDONALD, R.S., "Infrared spectrometry". *Analytical chemistry*. **58**(9): 1906, 1986.
26. DONALD A. BURNS, E.W.C., *Handbook of Near Infrared Analysis*. third ed. 2008.
27. REICH, G., "Near-infrared spectroscopy and imaging: basic principles and pharmaceutical applications". *Adv Drug Deliv Rev.* **57**(8): 1109, 2005.
28. BRERETON, R.G., "Introduction to multivariate calibration in analytical chemistry". *Analyst*. **125**(11): 2125, 2000.

29. KNÖZINGER, E., "Far-Infrared Fourier Spectroscopy as a Method for Structure Determination in Chemistry". *Angewandte Chemie International Edition in English*. **15**(1): 25, 1976.
30. PIMENTEL., K.M.G.L.I.M.R.J.A.M.S.S.M.F., "Sensores ópticos com detecção no infravermelho próximo e médio". *Química Nova*. **32**(6) 2009.
31. SKOOG, S.R.C.D.M.W.F.J.H.D.A., *Fundamentos de Química Analítica*. 8 ed. 2006: CENGAGE Learning.
32. WARTEWIG, S. & NEUBERT, R.H.H., "Pharmaceutical applications of Mid-IR and Raman spectroscopy". *Adv. Drug. Deliver. Rev.* **57**(8): 1144, 2005.
33. BUGAY, D.E., "Characterization of the solid-state: spectroscopic techniques". *Adv. Drug. Deliver. Rev.* **48**(1): 43, 2001.
34. PAUDEL, A.; RAJADA, D. & RANTANEN, J., "Raman spectroscopy in pharmaceutical product design". *Adv Drug Deliv Rev*, 2015.
35. VANKEIRSBILCK, T.V., A.; BAEYENS, W.; VAN DER WEKEN, G.; VERPOORT, F.; VERGOTE, G.; REMON, J.P., "Applications of Raman spectroscopy in pharmaceutical analysis". *Trends in analytical chemistry*. **21**(12): 8, 2002.
36. ANGEL, S.M.; CARRABBA, M. & COONEY, T.F., "The utilization of diode lasers for Raman spectroscopy". *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. **51**(11): 1779, 1995.
37. FDA, *Waiver of In Vivo Bioavailability and Bioequivalence Studies for Immediate-Release Solid Oral Dosage Forms Based on a Biopharmaceutics Classification System.*, SERVICES., U.S.D.O.H.A.H., Editor. 2015.
38. NASRALLAH, H.A.; KETTER, T.A. & KALALI, A.H., "Carbamazepine and valproate for the treatment of bipolar disorder: a review of the literature". *Journal of Affective Disorders*. **95**(1–3): 69, 2006.
39. ARAÚJO, D.S.; SILVA, H.R.R. & FREITAS, R.M., "Carbamazepina: uma revisão de literatura.". *Revista Eletrônica de Farmácia*. **II**(4): 30, 2010.
40. FLEISCHMAN, S.G.; KUDUVA, S.S.; MCMAHON, J.A.; MOULTON, B.; WALSH, R.D.B.; RODRIGUEZ-HORNEDO, N. & ZAWOROTKO, M.J., "Crystal engineering of the composition of pharmaceutical phases: Multiple-component crystalline solids involving carbamazepine". *Cryst. Growth Des.* **3**(6): 909, 2003.
41. MCMAHON, L.E.; TIMMINS, P.; WILLIAMS, A.C. & YORK, P., "Characterization of dihydrates prepared from carbamazepine polymorphs". *J. Pharm. Sci.* **85**(10): 1064, 1996.

42. KOBAYASHI, Y.; ITO, S.; ITAI, S. & YAMAMOTO, K., "Physicochemical properties and bioavailability of carbamazepine polymorphs and dihydrate". *International journal of pharmaceutics*. **193**(2): 137, 2000.
43. MEYER, M.C.; STRAUGHN, A.B.; MHATRE, R.M.; SHAH, V.P.; WILLIAMS, R.L. & LESKO, L.J., "The relative bioavailability and in vivo-in vitro correlations for four marketed carbamazepine tablets". *Pharm Res*. **15**(11): 1787, 1998.
44. FLICKER, F.; EBERLE, V.A. & BETZ, G., "Variability in commercial carbamazepine samples – Impact on drug release". *International journal of pharmaceutics*. **410**(1–2): 99, 2011.
45. ARONHIME., J.; KOSTAL, T.; SAMBURSKI, G.; LERMAN., O. & IZSAK., R., *Ezetimibe Polymorphs*. 2006: United States.
46. RAVIKUMAR, K. & SRIDHAR, B., "Ezetimibe monohydrate". *Acta Crystallogr. E*. **61**(9): 2907, 2005.
47. SUGANDHA, K.; KAITY, S.; MUKHERJEE, S.; ISAAC, J. & GHOSH, A., "Solubility Enhancement of Ezetimibe by a Cocrystal Engineering Technique". *Cryst. Growth Des.* **14**(9): 4475, 2014.
48. BALI, V.; ALI, M. & ALI, J., "Study of surfactant combinations and development of a novel nanoemulsion for minimising variations in bioavailability of ezetimibe". *Colloid. Surface. B*. **76**(2): 410, 2010.
49. homepage: http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2012/021445s0331bl.pdf. 2015. Acessada em 08/06/2015.
50. homepage: http://www.merck.ca/assets/en/pdf/products/ezetrol-pm_e.pdf, M.C.I., *Product monograph: Ezetrol ezetimibe tablets*. 2012. Acessada 15/05/2015.
51. BRAJ B. LOHRAY, V.B.L., BIPIN PANDEY, MAYANK G. DAVE, *Polimorphs and Amorphous form of (S)-(+)-Clopidogrel Bisulfate*. 2011, Cadira Healthcare Limited: United States.
52. BOUSQUET., A.; CASTRO., B. & SAINT-GERMAIN., J., *Polymorphic forms of Clopidogrel hydrogen sulfate*. 2003.
53. KORADIA, V.; CHAWLA, G. & BANSAL, A.K., "Qualitative and quantitative analysis of clopidogrel bisulphate polymorphs". *Acta Pharmaceutica*. **54**(3): 193, 2004.
54. FÉVOTTE, G., "In Situ Raman Spectroscopy for In-Line Control of Pharmaceutical Crystallization and Solids Elaboration Processes: A Review". *Chem. Eng. Res. Des.* **85**(7): 906, 2007.

55. ANVISA, http://portal.anvisa.gov.br/funcao_do_excipiente.pdf. 2015. Acessado em 17/04/2015.
56. PELLETIER, M.J., "Quantitative analysis using Raman spectrometry". *Appl Spectrosc.* **57**(1): 20A, 2003.
57. BRO, R., *Multy way analysis in the Food Industry in Departament of Dairy and Food Science*. 1998, Royal Veterinary and Agricultural University.
58. BEEBE, K.R. & KOWALSKI, B.R., "An introduction to multivariate calibration and analysis". *Analytical chemistry*. **59**(17): 1007A, 1987.
59. PERALTA-ZAMORA, P.; CORNEJO-PONCE, L.; NAGATA, N. & POPPI, R.J., "Alternativas quimiométricas para a resolução de problemas analíticos clássicos: determinação espectrofotométrica de misturas de zircônio e háfnio". *Química Nova*. **20**: 469, 1997.
60. NORGAARD, L.S., A.; WAGNER, J.; NIELSEN, J. P.; MUNCK, L; ENGELSEN, S.B., "Interval Partial Least-Squares Regression (iPLS): A Comparative Chemometric Study with an Example from Near-Infrared Spectroscopy". *society for applied spectroscopy*. **54**(3): 7, 2000.
61. DE JUAN, A. & TAULER, R., "Chemometrics applied to unravel multicomponent processes and mixtures". *Anal. Chim. Acta*. **500**(1-2): 195, 2003.
62. BRERETON, R.G., "A short history of chemometrics: a personal view". *J. Chemometr.* **28**(10): 749, 2014.
63. WOLD, S., "Chemometrics; what do we mean with it, and what do we want from it?". *Chemometr. Intell. Lab.* **30**(1): 109, 1995.
64. GELADI, P. & KOWALSKI, B.R., "Partial least-squares regression: a tutorial". *Anal. Chim. Acta*. **185**(0): 1, 1986.
65. BREITKREITZ, M.C.; SOUZA, A.M.D. & POPPI, R.J., "Experimento didático de quimiometria para planejamento de experimentos: avaliação das condições experimentais na determinação espectrofotométrica de ferro II com o-fenantrolina. Um tutorial, parte III". *Química Nova*. **37**: 564, 2014.
66. BRERETON, R.G., *Applied Chemometrics for Scientists*. 2007, The Atrium, Southgate, Chichester.: John Wiley & Sons.
67. DEJONG, S., "Simpls - an Alternative Approach to Partial Least-Squares Regression". *Chemometr. Intell. Lab.* **18**(3): 251, 1993.
68. MARÇO, P.H.; VALDERRAMA, P.; ALEXANDRINO, G.L.; POPPI, R.J. & TAULER, R., "RESOLUÇÃO MULTIVARIADA DE CURVAS COM MÍNIMOS QUADRADOS

ALTERNANTES: DESCRIÇÃO, FUNCIONAMENTO E APLICAÇÕES". *Química Nova*. **37**(7) 2014.

69. RUSTICHELLI, C.; GAMBERINI, G.; FERIOLI, V.; GAMBERINI, M.C.; FICARRA, R. & TOMMASINI, S., "Solid-state study of polymorphic drugs: carbamazepine". *J. Pharmaceut. Biomed.* **23**(1): 41, 2000.

70. ZHANG, Y.; GEIBEN, S.-U. & GAL, C., "Carbamazepine and diclofenac: Removal in wastewater treatment plants and occurrence in water bodies". *Chemosphere*. **73**(8): 1151, 2008.

71. HEINZ, A.; STRACHAN, C.J.; GORDON, K.C. & RADES, T., "Analysis of solid-state transformations of pharmaceutical compounds using vibrational spectroscopy". *J. Pharm. Pharmacol.* **61**(8): 971, 2009.

72. GETSOIAN, A.; LODAYA, R.M. & BLACKBURN, A.C., "One-solvent polymorph screen of carbamazepine". *International journal of pharmaceuticals*. **348**(1-2): 3, 2008.

73. MORRIS, K.R.; GRIESSER, U.J.; ECKHARDT, C.J. & STOWELL, J.G., "Theoretical approaches to physical transformations of active pharmaceutical ingredients during manufacturing processes". *Adv. Drug. Deliver. Rev.* **48**(1): 91, 2001.

74. O'SULLIVAN, B.; BARRETT, P.; HSIAO, G.; CARR, A. & GLENNON, B., "In Situ Monitoring of Polymorphic Transitions". *Organic Process Research & Development*. **7**(6): 977, 2003.

75. THRELFALL, T.L., "Analysis of organic polymorphs. A review". *Analyst*. **120**(10): 2435, 1995.

76. LANGKILDE, F.W.; SJOBLUM, J.; TEKENBERGS-HJELTE, L. & MRAK, J., "Quantitative FT-Raman analysis of two crystal forms of a pharmaceutical compound". *J Pharm Biomed Anal.* **15**(6): 687, 1997.

77. PELLOW-JARMAN, M.V.; HENDRA, P.J. & LEHNERT, R.J., "The dependence of Raman signal intensity on particle size for crystal powders". *Vib. Spectrosc.* **12**(2): 257, 1996.

78. LI, Y.; CHOW, P.S. & TAN, R.B.H., "Quantification of polymorphic impurity in an enantiotropic polymorph system using differential scanning calorimetry, X-ray powder diffraction and Raman spectroscopy". *International journal of pharmaceuticals*. **415**(1-2): 110, 2011.

79. SAVOLAINEN, M.; KOGERMANN, K.; HEINZ, A.; AALTONEN, J.; PELTONEN, L.; STRACHAN, C. & YLIRUUSI, J., "Better understanding of dissolution behaviour of amorphous drugs by in situ solid-state analysis using Raman spectroscopy". *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **71**(1): 71, 2009.

80. STRACHAN, C.J.; PRATIWI, D.; GORDON, K.C. & RADES, T., "Quantitative analysis of polymorphic mixtures of carbamazepine by Raman spectroscopy and principal components analysis". *Journal of Raman Spectroscopy*. **35**(5): 347, 2004.
81. OFFERDAHL, T.J.; SALSBURY, J.S.; DONG, Z.; GRANT, D.J.; SCHROEDER, S.A.; PRAKASH, I.; GORMAN, E.M.; BARICH, D.H. & MUNSON, E.J., "Quantitation of crystalline and amorphous forms of anhydrous neotame using ¹³C CPMAS NMR spectroscopy". *J. Pharm. Sci.* **94**(12): 2591, 2005.
82. ATEF, E.; CHAUHAN, H.; PRASAD, D.; KUMARI, D. & PIDGEON, C., "Quantifying Solid-State Mixtures of Crystalline Indomethacin by Raman Spectroscopy Comparison with Thermal Analysis". *ISRN Chromatography*. **2012**: 6, 2012.
83. GRZESIAK, A.L.; LANG, M.; KIM, K. & MATZGER, A.J., "Comparison of the four anhydrous polymorphs of carbamazepine and the crystal structure of form I". *J. Pharm. Sci.* **92**(11): 2260, 2003.
84. FARIAS, M. & CARNEIRO, R.L., "Simultaneous Quantification of Three Polymorphic Forms of Carbamazepine using Raman Spectroscopy and Multivariate Calibration". *Anal. Lett.* **47**(6): 1043, 2014.
85. HWANG, M.-S.; CHO, S.; CHUNG, H. & WOO, Y.-A., "Nondestructive determination of the ambroxol content in tablets by Raman spectroscopy". *J. Pharmaceut. Biomed.* **38**(2): 210, 2005.
86. TIAN, F.; ZHANG, F.; SANDLER, N.; GORDON, K.C.; MCGOVERIN, C.M.; STRACHAN, C.J.; SAVILLE, D.J. & RADES, T., "Influence of sample characteristics on quantification of carbamazepine hydrate formation by X-ray powder diffraction and Raman spectroscopy". *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **66**(3): 466, 2007.
87. HOEIL CHUNG, J.-S.L., MIN SI-KU, "Feasibility of Simultaneous Measurement of Xylene Isomers and Other Hydrocarbons in p-Xylene Production Processes Using Near-Infrared Spectroscopy". *Applied Spectroscopy*. **52**(6): 5, 1998.
88. BYRN, S.; PFEIFFER, R.; GANEY, M.; HOIBERG, C. & POOCHIKIAN, G., "Pharmaceutical Solids: A Strategic Approach to Regulatory Considerations". *Pharm. Res.* **12**(7): 945, 1995.
89. ARLIN, J.B.; PRICE, L.S.; PRICE, S.L. & FLORENCE, A.J., "A strategy for producing predicted polymorphs: catemeric carbamazepine form V". *Chem Commun (Camb)*. **47**(25): 7074, 2011.
90. LANG, M.; KAMPF, J.W. & MATZGER, A.J., "Form IV of carbamazepine". *J. Pharm. Sci.* **91**(4): 1186, 2002.

91. CALIANDRO, R.; DI PROFIO, G. & NICOLOTTI, O., "Multivariate analysis of quaternary carbamazepine-saccharin mixtures by X-ray diffraction and infrared spectroscopy". *J Pharm Biomed Anal.* **78-79**: 269, 2013.
92. FDA, *The Biopharmaceutics Classification System (BCS) Guidance*. 2014.
93. SOARES, F.L.F. & CARNEIRO, R.L., "Green Synthesis of Ibuprofen–Nicotinamide Cocrystals and In-Line Evaluation by Raman Spectroscopy". *Cryst. Growth Des.* **13**(4): 1510, 2013.
94. ROWE, R.C.; SHESKEY, P.J. & QUINN, M.E., *Handbook of Pharmaceutical excipients*. 6 ed. 2009: Pharmaceutical Press and American Pharmacists association. 888.
95. PUDIPEDDI, M. & SERAJUDDIN, A.T.M., "Trends in solubility of polymorphs". *J. Pharm. Sci.* **94**(5): 929, 2005.
96. VIPPAGUNTA, S.R.; BRITAIN, H.G. & GRANT, D.J., "Crystalline solids". *Adv. Drug Deliver. Rev.* **48**(Advanced Drug Delivery Reviews): 3, 2001.
97. FUCKE, K. & STEED, J.W., "X-ray and Neutron Diffraction in the Study of Organic Crystalline Hydrates". *Water.* **2**(3): 333, 2010.
98. FARIAS, M. & CARNEIRO, R.L., "Simultaneous Quantification of Three Polymorphic Forms of Carbamazepine in the Presence of Excipients Using Raman Spectroscopy". *Molecules.* **19**(9): 14128, 2014.
99. LINDENBERG, M.; KOPP, S. & DRESSMAN, J.B., "Classification of orally administered drugs on the World Health Organization Model list of Essential Medicines according to the biopharmaceutics classification system". *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **58**(2): 265, 2004.
100. MARIA L.A.D LESTARIA; FEBRI ARDIANA & INDRAYANTO, G., *Ezetimibe*, in *Profiles of Drug Substances, Excipients, and Related Methodology*. 2011, Elsevier.
101. SHIMPI, M.R.; CHILDS, S.L.; BOSTROM, D. & VELAGA, S.P., "New cocrystals of ezetimibe with l-proline and imidazole". *Crystengcomm.* **16**(38): 8984, 2014.
102. BRAGA, J.W. & POPPI, R.J., "Figures of merit for the determination of the polymorphic purity of carbamazepine by infrared spectroscopy and multivariate calibration". *J. Pharm. Sci.* **93**(8): 2124, 2004.
103. POMERANTSEV, A.L. & RODIONOVA, O.Y., "Process analytical technology: a critical view of the chemometricians". *J. Chemometr.* **26**(6): 299, 2012.
104. WOLD, S.; SJÖSTRÖM, M. & ERIKSSON, L., "PLS-regression: a basic tool of chemometrics". *Chemometr. Intell. Lab.* **58**(2): 109, 2001.
105. TAULER, R., *Multivariate Curve resolution Homepage*. 2015.

106. SOCRATES, G., *Infrared and Raman characteristic group frequencies*. third edition ed. 2001: John Wiley & Sons.
107. LU, J.; WANG, J. & ROHANI, S., "Preparation and characterization of amorphous, I and II forms of clopidogrel hydrogen sulfate". *Crystal Research and Technology*. **47**(5): 505, 2012.